



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0031749

(51)⁷ C12N 1/21; C12P 13/14

(13) B

(21) 1-2017-03876

(22) 02/10/2017

(30) 2016-195818 03/10/2016 JP

(45) 25/05/2022 410

(43) 26/04/2018 361A

(73) AJINOMOTO CO., INC. (JP)

15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-8315 Japan

(72) Mika MORIYA (JP); Kazuyuki HAYASHI (JP); Akari YOKOKAWA (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT L-AMIN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất axit L-amin như axit L-glutamic. Axit L-amin được sản xuất bằng cách nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin, vi khuẩn này đã được cải biến sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic như DctA, DcuA, và DcuB được gia tăng, trong môi trường nuôi cấy, và thu gom axit L-amin từ môi trường nuôi cấy hoặc các tế bào của vi khuẩn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất axit L-amin như axit L-glutamic bằng cách lên men sử dụng vi khuẩn. Các axit L-amin là hữu ích làm nguyên liệu cho gia vị và v.v..

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các axit L-amin được sản xuất trên quy mô công nghiệp bằng cách, ví dụ, lên men sử dụng các vi sinh vật như vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin (tài liệu phi sáng chế 1). Về các vi sinh vật này, ví dụ, các chủng được phân lập từ tự nhiên và các chủng đột biến của chúng đã được sử dụng. Ngoài ra, khả năng sản sinh axit L-amin của các vi sinh vật có thể được cải thiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Ví dụ, về cách thức nâng cao khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn, đã biết đến phương pháp gia tăng hoạt tính phosphoketolaza (tài liệu sáng chế 1) và sử dụng gen *yggB* đột biến (tài liệu sáng chế 2).

Các vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic khác nhau đã được nhận thấy trong vi khuẩn. Vi khuẩn có thể hấp thu và chuyển hóa các axit C4-dicarboxylic nhờ các vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic này. Ví dụ, đã biết rằng các protein được mã hóa bởi gen *dctA*, gen *dcuA*, và gen *dcuB* đều có khả năng hấp thu axit C4-dicarboxylic như axit aspartic (các tài liệu phi sáng chế 2 đến 3). Cũng biết rằng protein được mã hóa bởi gen *dctA* cũng có khả năng hấp thu axit L-glutamic (tài liệu phi sáng chế 4).

Ngoài ra, đã có báo cáo về phương pháp sản xuất axit L-amin bằng cách sử dụng vi khuẩn coryneform có sự gia tăng mức biểu hiện của gen *dctA* (tài liệu sáng chế 3). Tài liệu này đề cập đến ví dụ trong đó L-lysin được sản xuất bằng cách sử dụng vi khuẩn này. Ngược lại, trong khi các axit L-amin không phải là L-lysin, như axit L-glutamic, cũng được lấy làm ví dụ là axit L-amin trong tài liệu này, tài liệu này không giải thích xem các axit L-amin không phải L-lysin, như axit L-glutamic, có thể được sản xuất bằng cách sử dụng vi khuẩn nêu trên hay không.

Ngoài ra, đã biết rằng protein được mã hóa bởi gen *yggB* có khả năng tiết axit L-glutamic (tài liệu sáng chế 2 và tài liệu phi sáng chế 5).

Tài liệu tham khảo

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO2006/016705

Tài liệu sáng chế 2: WO2006/070944

Tài liệu sáng chế 3: US2002-0106759

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Akashi, K. et al., Amino Acid Fermentation. Japan Scientific Societies Press, p.195 to 215, 1986.

Tài liệu phi sáng chế 2: Karinou E. et al., The Escherichia coli SLC26 homologue YchM (DauA) is a C4-dicarboxylic acid transporter. Mol Microbiol. 2013 Feb;87(3):623-40.

Tài liệu phi sáng chế 3: Janausch IG. et al., C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. Biochim Biophys Acta. 2002 Jan 17;1553(1-2):39-56.

Tài liệu phi sáng chế 4: Youn et al., Characterization of the Dicarboxylate Transporter DctA in Corynebacterium glutamicum. Journal Of Bacteriology. 2009 Sept. 5480-5488.

Tài liệu phi sáng chế 5: Nakamura et al., Mutations of the Corynebacterium glutamicum NCgl1221 Gene, Encoding a Mechanosensitive Channel Homolog, Induce L-glutamic Acid Production. Applied and Environmental Microbiology. 2007 July 4491-4498.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích cần đạt được bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là phát triển kỹ thuật mới nhằm nâng cao khả năng sản sinh axit L-amin của vi khuẩn, và qua đó đề xuất phương pháp sản xuất axit L-amin một cách hiệu quả.

Cách thức đạt được mục đích của sáng chế

Để đạt được mục đích nêu trên, các tác giả sáng chế đã tiến hành các

nghiên cứu khác nhau. Nhờ đó, các tác giả sáng chế nhận thấy rằng khả năng sản sinh axit L-amin của vi khuẩn có thể được cải thiện bằng cách cải biến vi khuẩn sao cho mức biểu hiện của gen *dctA*, gen *dcuA*, hoặc gen *dcuB*, mã hóa vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic, được gia tăng, và hoàn thành sáng chế.

Sáng chế có thể bao gồm các đối tượng như sau.

[1] Phương pháp sản xuất axit L-amin, phương pháp này bao gồm:

nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin trong môi trường để tích tụ axit L-amin trong môi trường này và/hoặc các tế bào của vi khuẩn; và

thu gom axit L-amin từ môi trường và/hoặc các tế bào,

trong đó vi khuẩn đã được cải biến sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng so với chủng không được cải biến,

trong đó vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic gồm một hoặc nhiều loại protein được chọn từ các protein được mã hóa bởi gen *dctA*, gen *dcuA*, và gen *dcuB*, và

trong đó axit L-amin là axit L-amin khác với axit L-aspartic,

với điều kiện là axit L-amin là axit L-glutamic khi vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic là protein được mã hóa bởi gen *dctA*.

[2] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó gen *dctA* là gen mã hóa protein được xác định ở các mục (a), (b), hoặc (c) được nêu dưới đây:

(a) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 hoặc 18;

(b) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 hoặc 18, nhưng còn gồm cả sự thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, và/hoặc thêm đoạn của 1 đến 10 gốc axit amin, và có hoạt tính hấp thu axit L-aspartic;

(c) protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 hoặc 18, và có hoạt tính hấp thu axit aspartic.

[3] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó gen *dcuA* là gen mã hóa protein được xác định ở các mục (a), (b), hoặc (c) được nêu dưới đây:

(a) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20;

(b) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, nhưng còn gồm cả sự thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, và/hoặc thêm đoạn của 1 đến 10 gốc axit amin, và có hoạt tính hấp thu axit aspartic;

(c) protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, và có hoạt tính hấp thu axit aspartic.

[4] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó gen *dcuB* là gen mã hóa protein được xác định ở các mục (a), (b), hoặc (c) được nêu dưới đây:

(a) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22;

(b) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22, nhưng còn gồm cả sự thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, và/hoặc thêm đoạn của 1 đến 10 gốc axit amin, và có hoạt tính hấp thu axit aspartic;

(c) protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22, và có hoạt tính hấp thu axit aspartic.

[5] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng bằng cách gia tăng mức biểu hiện của gen mã hóa vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic.

[6] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó mức biểu hiện của gen được gia tăng bằng cách gia tăng số lượng bản sao của gen và/hoặc cải biến trình tự điều chỉnh mức biểu hiện của gen.

[7] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó vi khuẩn cần được cải biến sao cho hoạt tính của phosphoketolaza được gia tăng so với chủng không được cải biến.

[8] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó phosphoketolaza gồm D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và/hoặc fructoza-6-phosphat phosphoketolaza.

[9] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó hoạt tính của phosphoketolaza được gia tăng bằng cách gia tăng mức biểu hiện của gen mã hóa phosphoketolaza.

[10] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn coryneform hoặc vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae*.

[11] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn thuộc giống

Corynebacterium.

[12] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó vi khuẩn là *Corynebacterium glutamicum*.

[13] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn thuộc giống *Pantoea* hoặc *Escherichia*.

[14] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó vi khuẩn là *Pantoea ananatis* hoặc *Escherichia coli*.

[15] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó axit L-amin gồm axit L-amin của họ glutamat và/hoặc axit L-amin của họ aspartat.

[16] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó axit L-amin của họ glutamat gồm một hoặc nhiều axit L-amin được chọn từ axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-xitrulin, và L-ornitin.

[17] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó axit L-amin của họ glutamat là axit L-glutamic.

[18] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó axit L-glutamic là monoamoni L-glutamat hoặc mononatri L-glutamat.

[19] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó axit L-amin của họ aspartat gồm một hoặc nhiều axit L-amin được chọn từ L-lysin, L-threonin, L-isoleuxin, và L-methionin.

[20] Phương pháp được nêu ở trên,

trong đó axit L-amin là axit L-amin của họ glutamat, và

trong đó vi khuẩn đã được cải biến tiếp sao cho hoạt tính của α -ketoglutarat dehydrogenaza và/hoặc succinat dehydrogenaza được giảm so với chủng không được cải biến.

[21] Phương pháp được nêu ở trên,

trong đó vi khuẩn là vi khuẩn coryneform, và

trong đó vi khuẩn đã được cải biến tiếp để mang gen *yggB* đột biến.

[22] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó gen *yggB* đột biến là gen *yggB* có sự đột biến mà nâng cao khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn

coryneform.

[23] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó gen *yggB* đột biến là gen *yggB* có sự đột biến được xác định ở các mục (1), (2), hoặc (3) được nêu dưới đây:

- (1) sự đột biến ở vùng mã hóa cho gốc axit amin ở các vị trí từ 419 đến 533 của protein YggB kiểu dại,
- (2) sự đột biến ở vùng mã hóa cho vùng chuyển màng của protein YggB kiểu dại, và
- (3) sự kết hợp của các đột biến này.

[24] Phương pháp được nêu ở trên, trong đó protein YggB kiểu dại là protein được xác định ở các mục (a), (b), hoặc (c) được nêu dưới đây:

- (a) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10;
- (b) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, nhưng còn gồm cả sự thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, và/hoặc thêm đoạn của 1 đến 10 gốc axit amin, và có đặc tính là gia tăng mức biểu hiện của nó trong vi khuẩn coryneform để gia tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn coryneform;
- (c) protein bao gồm trình tự axit amin thể hiện độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, và có đặc tính là gia tăng mức biểu hiện của nó trong vi khuẩn coryneform để gia tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn coryneform.

Theo sáng chế, khả năng sản sinh axit L-amin của vi khuẩn có thể được cải thiện, và axit L-amin có thể được sản xuất một cách hiệu quả.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

[FIG. 1] Biểu đồ thể hiện các kết quả của quá trình nuôi cấy sản xuất axit glutamic bằng cách sử dụng chủng *C. glutamicum* có mức biểu hiện được gia tăng của gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic (Cg-dctA, Ec-dctA, Ec-dcuA, hoặc Ec-dcuB). (A) Lượng tích tụ axit glutamic (Glu), (B) lượng tích tụ axit aspartic (Asp).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được giải thích chi tiết.

Phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất axit L-amin bao gồm bước nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin trong môi trường để tích tụ axit L-amin trong môi trường này và/hoặc các tế bào của vi khuẩn, và thu gom axit L-amin từ môi trường nuôi cấy và/hoặc các tế bào của vi khuẩn, trong đó vi khuẩn đã được cải biến sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng. Vi khuẩn được sử dụng cho phương pháp này còn được gọi là "vi khuẩn theo sáng chế".

<1> Vi khuẩn theo sáng chế

Vi khuẩn theo sáng chế là vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin, vi khuẩn này đã được cải biến sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng.

<1-1> Vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin

Trong sáng chế, thuật ngữ "vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin" là để chỉ vi khuẩn có khả năng sản xuất và tích tụ axit L-amin mong muốn trong môi trường và/hoặc các tế bào của vi khuẩn ở mức mà axit L-amin có thể được thu gom, khi vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường. Vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin có thể là vi khuẩn mà có thể tích tụ axit L-amin mong muốn trong môi trường và/hoặc các tế bào của vi khuẩn ở lượng lớn hơn so với lượng có thể thu được với chủng không được cải biến. Thuật ngữ "chủng không được cải biến" là để chỉ chủng đối chứng mà không được cải biến đến mức hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng. Nghĩa là, các ví dụ về chủng không được cải biến bao gồm chủng kiểu dại và chủng cha mẹ. Vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin có thể là vi khuẩn mà có khả năng tích tụ axit L-amin mong muốn trong môi trường ở lượng tốt hơn là bằng hoặc lớn hơn 0,5g/L, tốt hơn nữa là bằng hoặc lớn hơn 1,0g/L.

Axit L-amin được sản xuất theo sáng chế là axit L-amin khác với axit L-aspartic. Các ví dụ về axit L-amin không phải là axit L-aspartic bao gồm các axit amin bazơ như L-lysin, L-ornitin, L-arginin, L-histidin, và L-citrulin; các axit amin béo như L-isoleuxin, L-alanin, L-valin, L-leuxin, và glyxin; các axit amin mà là các axit hydroxy-monoaminocarboxylic như L-threonin và L-serin; các axit amin vòng như L-prolin; các axit amin thơm như L-phenylalanin, L-tyrosin,

và L-tryptophan; các axit amin chứa lưu huỳnh như L-xystein, L-xystin, và L-methionin; các axit amin có tính axit như axit L-glutamic; và các axit amin có nhóm amit ở mạch bên như L-glutamin và L-asparagin. Các ví dụ cụ thể về axit L-amin không phải là axit L-aspartic bao gồm axit L-amin của họ glutamat và axit L-amin của họ aspartat. Thuật ngữ “axit L-amin của họ glutamat” là để chỉ axit L-glutamic và các axit L-amin mà được sinh tổng hợp nhờ axit L-glutamic làm hợp chất trung gian. Các ví dụ về các axit L-amin mà được sinh tổng hợp nhờ axit L-glutamic làm hợp chất trung gian bao gồm L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-xitrulin, và L-ornitin. Thuật ngữ “axit L-amin thuộc họ aspartat” là chỉ các axit L-amin mà được sinh tổng hợp nhờ axit L-aspartic làm hợp chất trung gian, và không bao gồm axit L-aspartic. Các ví dụ về các axit L-amin mà được sinh tổng hợp nhờ axit L-aspartic làm hợp chất trung gian bao gồm L-lysin, L-threonin, L-isoleuxin, và L-methionin. Các ví dụ cụ thể hơn về axit L-amin khác với axit L-aspartic bao gồm axit L-glutamic. Ví dụ, ít nhất khi vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic là protein được mã hóa bởi gen *dctA*, axit L-amin có thể là axit L-glutamic. Vi khuẩn theo sáng chế có thể có khả năng sản xuất một loại axit L-amin riêng biệt, hoặc hai hoặc nhiều loại axit L-amin.

Trong sáng chế, thuật ngữ “axit amin” là để chỉ axit L-amin, trừ phi được quy định khác. Trong sáng chế, thuật ngữ “axit L-amin” là để chỉ axit L-amin ở dạng tự do, muối của nó, hoặc hỗn hợp của nó, trừ phi được quy định khác. Các ví dụ về muối được mô tả dưới đây.

Các ví dụ về vi khuẩn bao gồm vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* và vi khuẩn coryneform.

Các ví dụ về vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* bao gồm vi khuẩn thuộc giống *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Photorhabdus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Morganella*, hoặc tương tự. Đặc biệt, vi khuẩn được phân loại thành họ *Enterobacteriaceae* theo nguyên tắc phân loại được sử dụng trong cơ sở dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>) có thể được sử dụng.

Vi khuẩn *Escherichia* không bị giới hạn một cách cụ thể, và các ví dụ của nó bao gồm vi khuẩn được phân loại thành giống *Escherichia* theo nguyên tắc phân loại đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực vi sinh vật học. Các ví dụ về vi khuẩn *Escherichia* bacteria bao gồm, ví dụ, vi khuẩn được mô tả trong tài liệu của Neidhardt và đồng tác giả (Backmann B.J., 1996, Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, pp.2460-2488, Table 1, In F.D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology/Second Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.). Các ví dụ về vi khuẩn *Escherichia* bao gồm, ví dụ, *Escherichia coli*. Các ví dụ cụ thể về *Escherichia coli* bao gồm, ví dụ, các chủng *Escherichia coli* K-12 như chủng W3110 (ATCC 27325) và chủng MG1655 (ATCC 47076); chủng *Escherichia coli* K5 (ATCC 23506); các chủng *Escherichia coli* B như chủng BL21 (DE3); và các chủng có nguồn gốc từ vi khuẩn này.

Vi khuẩn *Enterobacter* không bị giới hạn một cách cụ thể, và các ví dụ bao gồm vi khuẩn được phân loại thành giống *Enterobacter* theo nguyên tắc phân loại đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực vi sinh vật học. Các ví dụ về vi khuẩn *Enterobacter* bao gồm, ví dụ, *Enterobacter agglomerans* và *Enterobacter aerogenes*. Các ví dụ cụ thể về *Enterobacter agglomerans* bao gồm, ví dụ, chủng *Enterobacter agglomerans* ATCC 12287. Các ví dụ cụ thể về *Enterobacter aerogenes* bao gồm, ví dụ, chủng *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, chủng NBRC 12010 (Biotechnol. Bioeng., 2007, Mar. 27;98(2):340-348), và chủng AJ110637 (FERM BP-10955). Các ví dụ về vi khuẩn *Enterobacter* còn bao gồm, ví dụ, các chủng được đề cập trong đơn yêu cầu cấp patent châu Âu chưa xét nghiệm (EP-A) số 0952221. Ngoài ra, *Enterobacter agglomerans* còn bao gồm vài chủng được phân loại là *Pantoea agglomerans*.

Vi khuẩn *Pantoea* không bị giới hạn một cách cụ thể, và các ví dụ bao gồm vi khuẩn được phân loại thành giống *Pantoea* theo nguyên tắc phân loại đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực vi sinh vật học. Các ví dụ các vi khuẩn *Pantoea* bao gồm, ví dụ, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*,

Pantoea agglomerans, và *Pantoea citrea*. Các ví dụ cụ thể về *Pantoea ananatis* bao gồm, ví dụ, chủng *Pantoea ananatis* LMG20103, chủng AJ13355 (FERM BP-6614), chủng AJ13356 (FERM BP-6615), chủng AJ13601 (FERM BP-7207), chủng SC17 (FERM BP-11091), chủng SC17(0) (VKPM B-9246), và chủng SC17sucA (FERM BP-8646). Vài vi khuẩn *Enterobacter* và *Erwinia* được phân loại lại thành giống *Pantoea* (Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 337-345 (1989); Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 162-173 (1993)). Ví dụ, vài chủng *Enterobacter agglomerans* hiện được phân loại lại thành *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, hoặc tương tự trên cơ sở phân tích trình tự nucleotit của 16S ARN ribosom v.v. (Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 337-345 (1989)). Theo sáng chế, các vi khuẩn *Pantoea* bao gồm các vi khuẩn được phân loại lại thành giống *Pantoea* như được mô tả ở trên.

Các ví dụ về các vi khuẩn *Erwinia* bao gồm *Erwinia amylovora* và *Erwinia carotovora*. Các ví dụ về các vi khuẩn *Klebsiella* gồm *Klebsiella planticola*.

Các ví dụ về các vi khuẩn coryneform bao gồm các vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, hoặc tương tự.

Các ví dụ cụ thể về các vi khuẩn coryneform bao gồm các loài sau đây.

Corynebacterium acetoacidophilum

Corynebacterium acetoglutamicum

Corynebacterium alkanolyticum

Corynebacterium callunae

Corynebacterium crenatum

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium lilium

Corynebacterium melassecola

Corynebacterium thermoaminogenes (*Corynebacterium efficiens*)

Corynebacterium herculis

Brevibacterium divaricatum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium flavum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium immariophilum

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium roseum

Brevibacterium saccharolyticum

Brevibacterium thiogenitalis

Corynebacterium ammoniagenes (*Corynebacterium stationis*)

Brevibacterium album

Brevibacterium cerinum

Microbacterium ammoniaphilum

Các ví dụ cụ thể về các vi khuẩn coryneform bao gồm các chủng sau đây.

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium crenatum AS1.542

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 13869, FERM BP-734

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium efficiens (*Corynebacterium thermoaminogenes*) AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 14020

Brevibacterium flavum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Corynebacterium ammoniagenes (*Corynebacterium stationis*) ATCC 6871, ATCC 6872

Brevibacterium album ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354

Các vi khuẩn *Corynebacterium* bao gồm các vi khuẩn mà đã được phân loại trước thành giống *Brevibacterium*, nhưng hiện nay được hợp nhất thành giống *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1991)). Hơn nữa, *Corynebacterium stationis* bao gồm các vi khuẩn mà đã được phân loại trước đó là *Corynebacterium ammoniagenes*, nhưng hiện nay được phân loại lại thành *Corynebacterium stationis* trên cơ sở phân tích trình tự nucleotit của 16S ARN ribosom v.v. (Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 874-879 (2010)).

Các chủng này có thể mua được từ, ví dụ, American Type Culture Collection (Address: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America). Nghĩa là, các số đăng kí được gán cho các chủng tương ứng, và các chủng này có thể được sắp xếp theo các số đăng kí này (xem <http://www.atcc.org/>). Các số đăng kí của các chủng được liệt kê trong bảng mục lục của American Type Culture Collection. Các chủng này cũng có thể thu được từ, ví dụ, các kho lưu giữ tại đó các chủng được lưu giữ.

Vi khuẩn theo sáng chế có thể là vi khuẩn sẵn có khả năng sản sinh axit L-amin, hoặc có thể là vi khuẩn được cải biến sao cho nó có khả năng sản sinh axit L-amin. Vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin có thể thu được bằng cách truyền khả năng sản sinh axit L-amin cho vi khuẩn như nêu trên, hoặc bằng cách gia tăng khả năng sản sinh axit L-amin của vi khuẩn này như nêu trên.

Để truyền hoặc gia tăng khả năng sản sinh axit L-amin, các phương pháp thông thường được sử dụng trong quá trình nhân giống chủng vi khuẩn coryneform sản xuất axit amin, vi khuẩn *Escherichia*, và v.v. (tham khảo tài liệu "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1st Edition, published May 30, 1986, pp.77-100) có thể được sử dụng. Các ví dụ về các phương pháp như vậy bao gồm, ví dụ, thu lấy chủng đột biến khuyết dưỡng, thu lấy chủng kháng chất đồng đẳng axit L-amin, thu lấy chủng đột biến điều hòa sự trao đổi chất, và tạo ra chủng tái tổ hợp trong đó hoạt tính của enzym sinh tổng hợp axit L-amin được gia tăng. Trong quá trình nhân giống vi khuẩn sản xuất axit L-amin, một trong số các đặc tính nêu trên như sự đột biến khuyết dưỡng, kháng chất đồng đẳng, và điều hòa sự trao đổi chất có thể được truyền riêng biệt, hoặc hai hoặc nhiều đặc tính trong số các đặc tính này có thể được truyền kết hợp. Ngoài ra, trong quá trình nhân giống vi khuẩn sản xuất axit L-amin, hoạt tính của một enzym trong số các enzym sinh tổng hợp axit L-amin có thể được gia tăng riêng biệt, hoặc các hoạt tính của hai hoặc ba hoặc nhiều enzym có thể được kết hợp gia tăng. Hơn nữa, việc truyền (các) đặc tính như sự đột biến khuyết dưỡng, kháng chất đồng đẳng, và điều hòa sự trao đổi chất có thể được kết hợp với việc gia tăng (các) hoạt tính của (các) enzym sinh tổng hợp.

Chủng đột biến khuyết dưỡng, chủng kháng chất đồng đẳng, hoặc chủng đột biến điều hòa sự trao đổi chất có khả năng sản sinh axit L-amin có thể thu được bằng cách xử lý chủng cha mẹ hoặc chủng kiểu dại bằng quá trình gây đột biến thông thường, và sau đó chọn lọc chủng thể hiện sự đột biến tự dưỡng, sự đột biến kháng chất đồng đẳng, hoặc sự đột biến điều hòa sự trao đổi chất, và có khả năng sản sinh axit L-amin từ các chủng đột biến thu được. Các ví dụ về quá trình xử lý gây đột biến thông thường bao gồm sự chiếu tia X hoặc tia cực tím và quá trình xử lý bằng tác nhân gây đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), ethyl metansulfonat (EMS), và metyl metansulfonat (MMS).

Khả năng sản sinh axit L-amin cũng có thể được truyền hoặc được gia tăng bằng cách gia tăng hoạt tính của enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp của axit L-amin mong muốn. Hoạt tính enzym có thể được gia tăng bằng

cách, ví dụ, cải biến vi khuẩn sao cho mức biểu hiện của gen mã hóa enzym này được gia tăng. Các phương pháp gia tăng mức biểu hiện gen được đề cập trong WO00/18935, EP1010755A, và các tài liệu khác. Chi tiết về quá trình gia tăng hoạt tính enzym sẽ được mô tả dưới đây.

Hơn nữa, khả năng sản sinh axit L-amin cũng có thể được truyền hoặc gia tăng bằng cách giảm hoạt tính của enzym xúc tác phản ứng tách ra từ chu trình sinh tổng hợp axit L-amin mong muốn để tạo ra hợp chất khác với axit L-amin mong muốn. Cụm từ "enzym xúc tác phản ứng tách ra từ chu trình sinh tổng hợp axit L-amin mong muốn để tạo ra hợp chất khác với axit L-amin mong muốn" được đề cập ở đây bao gồm enzym liên quan đến sự phân hủy axit amin mong muốn. Phương pháp giảm hoạt tính enzym sẽ được mô tả dưới đây.

Sau đây, vi khuẩn sản xuất axit L-amin và các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản sinh axit L-amin sẽ được đề cập một cách cụ thể. Tất cả các đặc tính của vi khuẩn sản xuất axit L-amin và các sự cải biến để truyền hoặc gia tăng khả năng sản sinh axit L-amin có thể được sử dụng độc lập hoặc theo sự kết hợp thích hợp bất kỳ.

<Vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic>

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp axit L-glutamic. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, glutamat dehydrogenaza (*gdhA*), glutamin synthetaza (*glnA*), glutamat syntaza (*gltBD*), isoxitrat dehydrogenaza (*icdA*), aconitat hydrataza (*acnA*, *acnB*), xitrat syntaza (*gltA*), metylxitrat syntaza (*prpC*), pyruvat carboxylaza (*pyc*), pyruvat dehydrogenaza (*aceEF*, *lpdA*), pyruvat kinaza (*pykA*, *pykF*), phosphoenolpyruvat syntaza (*ppsA*), enolaza (*eno*), phosphoglyxeromutaza (*pgmA*, *pgmI*), phosphoglyxerat kinaza (*pgk*), glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (*gapA*), trioza phosphat isomeraza (*tpiA*), fructoza bisphosphat aldolaza (*fbp*), glucoza phosphat isomeraza (*pgi*), 6-phosphogluconat dehydrataza (*edd*), 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconat aldolaza (*eda*), và transhydrogenaza. Được thể hiện

trong dấu ngoặc đơn sau tên gọi của các enzym là các ví dụ về các gen mã hóa các enzym này (điều này được áp dụng cho các trường hợp tương tự dưới đây). Tốt hơn là gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ, ví dụ, glutamat dehydrogenaza, xitrat syntaza, phosphoenol pyruvat carboxylaza, và metylxitrat syntaza, trong số các enzym nêu trên.

Các ví dụ về các chủng thuộc họ *Enterobacteriaceae* và được cải biến sao cho mức biểu hiện của gen xitrat syntaza, gen phosphoenolpyruvat carboxylaza, và/hoặc gen glutamat dehydrogenaza được gia tăng bao gồm các chủng được đề cập trong EP1078989A, EP955368A, và EP952221A. Hơn nữa, các ví dụ về các chủng thuộc họ *Enterobacteriaceae* và được cải biến sao cho mức biểu hiện của gen của chu trình Entner-Doudoroff (*edd*, *eda*) được gia tăng bao gồm các chủng được đề cập trong EP1352966B. Các ví dụ về vi khuẩn coryneform được cải biến sao cho mức biểu hiện của gen glutamat synthetaza (*gltBD*) được gia tăng bao gồm các vi khuẩn coryneform được đề cập trong WO99/07853.

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic còn bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự giảm hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym mà xúc tác phản ứng tách ra từ chu trình sinh tổng hợp axit L-glutamic để tạo ra hợp chất khác với axit L-glutamic. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, isoxitrat lyaza (*aceA*), α -ketoglutarat dehydrogenaza (*sucA*, *odhA*), axetolactat syntaza (*ilvI*), format axetyltransferaza (*pfl*), lactat dehydrogenaza (*ldh*), alcohol dehydrogenaza (*adh*), glutamat decarboxylaza (*gadAB*), và succinat dehydrogenaza (*sdhABCD*). Tốt hơn là giảm hoặc loại bỏ, ví dụ, hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza, trong số các enzym nêu trên.

Vi khuẩn *Escherichia* có hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza bị giảm hoặc không có hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza, và các phương pháp thu được các vi khuẩn này được đề cập trong các patent Mỹ số 5,378,616 và 5,573,945. Hơn nữa, các phương pháp giảm hoặc loại bỏ hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza của vi khuẩn *Enterobacteriaceae* như vi khuẩn *Pantoea*, vi khuẩn *Enterobacter*, vi khuẩn *Klebsiella*, và vi khuẩn *Erwinia* được đề cập trong các

patent Mỹ số 6,197,559, 6,682,912, 6,331,419, và 8,129,151, và WO2008/075483. Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn *Escherichia* có hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza bị giảm hoặc khuyết hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza bao gồm các chủng sau đây.

E. coli W3110sucA::Km^r

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)

E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

E. coli W3110sucA::Km^r là chủng thu được bằng cách làm đứt gãy gen *sucA* mã hóa α -ketoglutarat dehydrogenaza của *E. coli* W3110. Chủng này hoàn toàn không có hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza.

Vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza được giảm hoặc được loại trừ, và các phương pháp thu lấy các vi khuẩn này được đề cập trong WO2008/075483. Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza được giảm hoặc được loại trừ bao gồm, ví dụ, các chủng sau đây.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) L30-2 (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2006-340603)

Chủng *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) Δ S (WO95/34672)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12821 (FERM BP-4172, patent Pháp số 9401748)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ12822 (FERM BP-4173, patent Pháp số 9401748)

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174, patent Pháp số 9401748).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và các chủng cha mẹ để thu được các vi khuẩn này còn bao gồm vi khuẩn *Pantoea* như chủng *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614), chủng *Pantoea ananatis* SC17 (FERM BP-

11091), và chủng *Pantoea ananatis* SC17(0) (VKPM B-9246). Chủng AJ13355 là chủng được phân lập từ đất ở Iwata-shi, Shizuoka-ken, Nhật Bản làm chủng mà có thể tăng sinh trong môi trường có độ pH thấp chứa axit L-glutamic và nguồn cacbon. Chủng SC17 là chủng được chọn làm chủng đột biến sinh dịch nhầy ở mức thấp từ chủng AJ13355 (patent Mỹ số 6,596,517). Chủng SC17 được lưu giữ ở cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (nay là cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) ngày 4 tháng 2 năm 2009, và được đăng kí số truy cập FERM BP-11091. Chủng AJ13355 được lưu giữ ở National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology (nay là cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) ngày 19 tháng 2 năm 1998 và được đăng kí số truy cập FERM P-16644. Sau đó, mẫu lưu giữ này được chuyển thành mẫu lưu giữ quốc tế dưới các điều khoản của Hiệp ước Budapest ngày 11 tháng 1 năm 1999, và được đăng kí số truy cập FERM BP-6614.

Hơn nữa, các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và các chủng cha mẹ để thu được các vi khuẩn này còn bao gồm vi khuẩn *Pantoea* có hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza bị giảm hoặc thiếu hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza. Các ví dụ về các chủng như vậy bao gồm chủng AJ13356 (patent Mỹ số 6,331,419), là chủng khuyết gen α -ketoglutarat dehydrogenaza có cấu trúc siêu phân tử E1 (*sucA*) của chủng AJ13355, và chủng SC17*sucA* (patent Mỹ số 6,596,517) là chủng khuyết gen *sucA* của chủng SC17. Chủng AJ13356 được lưu giữ ở National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (nay là cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) ngày 19 tháng 2 năm 1998, và được đăng kí số truy cập FERM P-16645.

Sau đó, mẫu lưu giữ này được chuyển thành mẫu lưu giữ quốc tế dưới các điều khoản của Hiệp ước Budapest ngày 11 tháng 1 năm 1999, và được đăng kí số truy cập FERM BP-6616. Chủng SC17sucA được đăng kí mã số AJ417, và được lưu giữ ở cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (nay là cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depositary, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) ngày 26 tháng 2 năm 2004, dưới số truy cập FERM BP-8646.

Chủng AJ13355 được xác nhận là *Enterobacter agglomerans* khi được phân lập, nhưng gần đây được phân loại lại là *Pantoea ananatis* trên cơ sở xác định trình tự nucleotit của 16S ARN ribosom và v.v.. Do vậy, mặc dù các chủng AJ13355 và AJ13356 được lưu giữ ở kho lưu giữ nêu trên là *Enterobacter agglomerans*, nhưng trong bản mô tả này chúng được gọi là *Pantoea ananatis*.

Hơn nữa, các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và các chủng cha mẹ để từ đó thu được các vi khuẩn này còn bao gồm vi khuẩn *Pantoea* như chủng *Pantoea ananatis* SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB, chủng *Pantoea ananatis* AJ13601, chủng *Pantoea ananatis* NP106, và chủng *Pantoea ananatis* NA1. Chủng SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB thu được bằng cách đưa plasmit RSFCPG chứa gen xitrat syntaza (*gltA*), gen phosphoenolpyruvat carboxylaza (*ppc*), và gen glutamat dehydrogenaza (*gdhA*) thu được từ *Escherichia coli*, và plasmit pSTVCB chứa gen xitrat syntaza (*gltA*) thu được từ *Brevibacterium lactofermentum*, vào trong chủng SC17sucA. Chủng AJ13601 là chủng được chọn từ chủng SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB làm chủng chịu được nồng độ cao của axit L-glutamic ở độ pH thấp. Chủng NP106 thu được từ chủng AJ13601 bằng cách xử lý các plasmit RSFCPG và pSTVCB. Chủng NA1 thu được từ chủng NP106 bằng cách đưa plasmit RSFPPG vào (WO2010/027045). Plasmit RSFPPG có cấu trúc tương ứng với plasmit RSFCPG chỉ khác là gen *gltA* của nó đã được thay thế bằng gen metyloxitrat syntaza (*prpC*), và vì vậy, chứa gen *prpC*, gen *ppc*, và gen *gdhA* (WO2008/020654). Chủng AJ13601 được lưu giữ ở National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial

Science and Technology (nay là cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) ngày 18 tháng 8 năm 1999, và được đăng ký số truy cập FERM P-17516. Sau đó, mẫu lưu giữ này được chuyển thành mẫu lưu giữ quốc tế dưới các điều khoản của Hiệp ước Budapest ngày 6 tháng 7 năm 2000, và được đăng ký số truy cập FERM BP-7207.

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm các chủng trong đó cả hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza (*sucA*) và hoạt tính succinat dehydrogenaza (*sdh*) được giảm hoặc loại bỏ (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2010-041920). Các ví dụ cụ thể về các chủng như vậy bao gồm, ví dụ, chủng khuyết thiếu kép *sucAsdhA* của chủng *Pantoea ananatis* NA1 và chủng khuyết thiếu kép *odhAsdhA* của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, nghĩa là chủng *Corynebacterium glutamicum* 8L3G Δ SDH (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2010-041920).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm các chủng đột biến khuyết dưỡng. Các ví dụ cụ thể về các chủng đột biến khuyết dưỡng bao gồm, ví dụ, *E. coli* VL334thrC⁺ (VKPM B-8961, EP1172433). *E. coli* VL334 (VKPM B-1641) là chủng khuyết dưỡng L-isoleuxin và L-threonin có các sự đột biến ở các gen *thrC* và *ilvA* (patent Mỹ số 4,278,765). *E. coli* VL334thrC⁺ là vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic khuyết dưỡng L-isoleuxin thu được bằng cách đưa alen kiểu đại của gen *thrC* vào trong chủng VL334. Alen kiểu đại của gen *thrC* được đưa vào bằng phương pháp tải nạp thông thường sử dụng thể thực khuẩn P1 sinh trưởng trên các tế bào của chủng *E. coli* K-12 kiểu đại (VKPM B-7).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm các chủng có tính kháng chất đồng đẳng axit aspartic. Các chủng như vậy cũng có thể thiếu hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza. Các ví dụ cụ thể về các chủng có tính kháng chất đồng đẳng axit aspartic và thiếu hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza bao gồm, ví dụ, *E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807, Patent Mỹ số 5,908,768), *E. coli* FFRM P-12379, mà có khả năng phân

hủy axit L-glutamic được giảm (patent Mỹ số 5,393,671), và *E. coli* AJ13138 (FERM BP-5565, patent Mỹ số 6,110,714).

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic còn bao gồm, ví dụ, phương pháp gia tăng mức biểu hiện của gen gây tiết axit L-glutamic, như gen *yhfK* (WO2005/085419) hoặc gen *ybjL* (WO2008/133161).

Hơn nữa, các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic cho hoặc trong vi khuẩn coryneform còn bao gồm các phương pháp truyền tính kháng chất đồng đẳng axit hữu cơ, chất ức chế hô hấp, hoặc tương tự, và các phương pháp truyền tính miễn cảm đối với chất ức chế tổng hợp thành tế bào. Các ví dụ cụ thể về các phương pháp này bao gồm, ví dụ, phương pháp truyền tính kháng axit monofloaxetic (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 50-113209), phương pháp truyền tính kháng adenin hoặc tính kháng thymine (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 57-065198), phương pháp làm suy giảm ureaza (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 52-038088), phương pháp truyền tính kháng axit malonic (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 52-038088), phương pháp truyền tính kháng benzopyron hoặc naphthoquinon (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-1889), phương pháp truyền tính kháng HOQNO (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-140895), phương pháp truyền tính kháng axit α -ketomalonic (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 57-2689), phương pháp truyền tính kháng guanidine (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-35981), phương pháp truyền tính miễn cảm với penicillin (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 4-88994), và v.v..

Các ví dụ cụ thể về các vi khuẩn có tính kháng hoặc có tính miễn cảm như vậy bao gồm các chủng sau đây.

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ3949 (FERM BP-2632, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 50-113209)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 57-065198)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11355 (FERM P-5007, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-1889)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-1889)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11217 (FERM P-4318, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 57-2869)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 57-2869)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11564 (FERM BP-5472, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-140895)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11439 (FERM BP-5136, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-35981)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 04-88994)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11426 (FERM P-5123, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-048890)

Corynebacterium glutamicum AJ11440 (FERM P-5137, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-048890)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11796 (FERM P-6402, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 58-158192).

Hơn nữa, các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic cho hoặc trong vi khuẩn coryneform còn bao gồm phương pháp gia tăng mức biểu hiện của gen *yggB* và phương pháp đưa vào gen *yggB* đột biến có sự đột biến trong vùng mã hóa (WO2006/070944). Nghĩa là, vi

khuẩn theo sáng chế có thể đã được cải biến sao cho mức biểu hiện của gen *yggB* được gia tăng, hoặc có thể đã được cải biến để mang (có) gen *yggB* đột biến.

Gen *yggB* là gen mã hóa kênh nhạy cảm cơ học. Các ví dụ về gen *yggB* bao gồm các gen *yggB* của vi khuẩn coryneform. Các ví dụ cụ thể về các gen *yggB* của vi khuẩn coryneform bao gồm, ví dụ, các gen *yggB* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC14967, và *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 (WO2006/070944). Gen *yggB* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 tương ứng với trình tự bổ trợ cho trình tự có số nucleotit từ 1.336.091 đến 1.337.692 trong trình tự hệ gen được đăng kí dưới số truy cập Genbank NC_003450 trong cơ sở dữ liệu NCBI, và còn được gọi là *NCgl1221*. Protein *YggB* được mã hóa bởi gen *yggB* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 được đăng kí dưới số truy cập Genbank NP_600492. Ngoài ra, trình tự nucleotit của gen *yggB* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) và trình tự axit amin của protein *YggB* được mã hóa bởi gen này được thể hiện trong các SEQ ID NO: 9 và 10.

Theo sáng chế, gen *yggB* có "sự đột biến đặc hiệu" được đề cập dưới đây còn được gọi là "gen *yggB* đột biến", và protein được mã hóa bởi gen đó cũng được gọi là "protein *YggB* đột biến". Hơn nữa, theo sáng chế, gen *yggB* không có "sự đột biến đặc hiệu" được đề cập dưới đây còn được gọi là "gen *yggB* kiểu đại", và protein được mã hóa bởi gen đó cũng được gọi là "protein *YggB* kiểu đại". Hơn nữa, liên quan đến protein *YggB*, sự thay đổi trình tự axit amin được gây ra bởi "sự đột biến đặc hiệu" ở gen *yggB* cũng được gọi là "sự đột biến đặc hiệu". Thuật ngữ "kiểu đại" được đề cập ở đây được sử dụng để phân biệt gen *yggB* "kiểu đại" hoặc protein *YggB* "kiểu đại" với gen *yggB* "đột biến" hoặc protein *YggB* "đột biến", và gen *yggB* "kiểu đại" hoặc protein *YggB* "kiểu đại" không bị giới hạn ở gen hoặc protein thu được dưới dạng các chất tự nhiên, miễn là nó không có "sự đột biến đặc hiệu". Các ví dụ về protein *YggB* kiểu đại bao gồm các protein *YggB* được lấy làm ví dụ ở trên, như protein *YggB* có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10. Các ví dụ về protein *YggB* kiểu đại còn bao gồm các thể biến dị bảo toàn (các thể biến dị trong đó chức năng ban đầu của chúng được

duy trì) của các protein *YggB* được lấy làm ví dụ ở trên, với điều kiện là các thể biến dị bảo toàn không có "sự đột biến đặc hiệu". "Chức năng ban đầu" liên quan đến protein *YggB* có thể là, ví dụ, chức năng như kênh nhạy cảm cơ học hoặc đặc tính gia tăng mức biểu hiện của nó trong vi khuẩn coryneform làm gia tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn coryneform.

"Sự đột biến đặc hiệu" không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là nó làm thay đổi trình tự axit amin của protein *YggB* như được nêu ở trên để bằng cách đó nâng cao khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn coryneform. Các ví dụ về "sự đột biến đặc hiệu" bao gồm sự đột biến ở phía đầu kết thúc C và sự đột biến ở vùng chuyển màng. "Sự đột biến đặc hiệu" cũng có thể là sự kết hợp của các sự đột biến này.

(1) Sự đột biến ở phía đầu kết thúc C

Sự đột biến ở phía đầu kết thúc C là sự đột biến được đưa vào trong vùng của gen *yggB* kiểu đại mã hóa cho gốc axit amin ở các vị trí 419 đến 533 của protein *YggB* kiểu đại. Sự đột biến ở phía đầu kết thúc C có thể được đưa vào ở một hoặc nhiều vị trí trong vùng này. Kiểu thay đổi trình tự axit amin được gây ra bởi sự đột biến ở phía đầu kết thúc C không bị giới hạn một cách cụ thể. Sự đột biến ở phía đầu kết thúc C có thể là sự đột biến gây ra sự thay thế axit amin (sự đột biến nhầm nghĩa), sự xen gốc axit amin, sự loại bỏ gốc axit amin, sự đưa vào codon kết thúc (sự đột biến vô nghĩa), sự đột biến dịch khung, hoặc sự kết hợp của các đột biến này. Sự đột biến ở phía đầu kết thúc C tốt hơn là, ví dụ, sự đột biến để xen trình tự nucleotit như trình tự xen đoạn (từ giờ trở đi được gọi là "IS") hoặc gen nhảy.

(1-1) Sự xen trình tự nucleotit

Các ví dụ về sự đột biến ở phía đầu kết thúc C bao gồm, ví dụ, sự đột biến xen trình tự nucleotit ở vị trí mã hóa cho gốc valin ở vị trí 419 của protein *YggB* kiểu đại (sự đột biến kiểu 2A-1). Sự đột biến kiểu 2A-1 có thể là, ví dụ, sự đột biến mà gây ra sự loại bỏ hoặc thay thế cho một phần hoặc toàn bộ các gốc axit amin ở các vị trí 419 đến 533 của protein *YggB* kiểu đại. Các ví dụ cụ thể về gen *yggB* đột biến có sự đột biến kiểu 2A-1 bao gồm, ví dụ, gen *yggB* chứa IS được xen vào vị trí bên cạnh "G" ở vị trí 1255 trong SEQ ID NO: 9, và bằng

cách đó mã hóa cho protein *YggB* đột biến có độ dài đầy đủ 423 gốc amino, ngắn hơn độ dài của protein *YggB* kiểu đại ban đầu (SEQ ID NO: 10). Trình tự nucleotit của gen *yggB* đột biến (V419::IS) và trình tự axit amin của protein *YggB* đột biến được mã hóa bởi gen được thể hiện trong các SEQ ID NO: 11 và 12. Trong SEQ ID NO: 11, các vị trí 1 đến 1269 tương ứng với CDS cho protein *YggB* đột biến này (V419::IS). Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic có gen *yggB* đột biến (V419::IS) bao gồm, ví dụ, chủng *C. glutamicum* 2256 Δ sucA Δ ldhA *yggB** (WO2014/185430).

(1-2) Sự thay thế cho các gốc prolin

Các ví dụ về sự đột biến ở phía đầu kết thúc C còn bao gồm, ví dụ, sự đột biến mà thay thế gốc prolin hiện diện ở các vị trí 419 đến 533 của protein *YggB* kiểu đại bằng gốc axit amin khác. Các ví dụ về gốc prolin này bao gồm các gốc prolin ở các vị trí 424, 437, 453, 457, 462, 469, 484, 489, 497, 515, 529, và 533 của protein *YggB* kiểu đại. Tốt nhất là thay thế (các) gốc prolin của (các) vị trí 424 và/hoặc 437 bằng (các) gốc axit amin khác. "Axit amin khác" không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là axit amin xuất hiện một cách tự nhiên không phải là prolin. Các ví dụ về "axit amin khác" bao gồm Lys, Glu, Thr, Val, Leu, Ile, Ser, Asp, Asn, Gln, Arg, Cys, Met, Phe, Trp, Tyr, Gly, Ala, và His. Ví dụ, tốt hơn là gốc prolin ở vị trí 424 có thể được thay thế bằng gốc axit amin kỵ nước (Ala, Gly, Val, Leu, hoặc Ile), tốt hơn nữa là gốc axit amin mạch nhánh (Leu, Val, hoặc Ile). Hơn nữa, ví dụ, tốt hơn là gốc prolin ở vị trí 437 có thể được thay thế bằng gốc axit amin có nhóm hydroxyl ở mạch bên (Thr, Ser, hoặc Tyr), tốt hơn nữa là bằng gốc Ser.

(2) Sự đột biến ở vùng chuyển màng

Protein *YggB* được cho là có năm vùng chuyển màng. Các vùng chuyển màng này tương ứng với gốc axit amin ở các vị trí 1 đến 23 (vùng chuyển màng thứ nhất), các vị trí 25 đến 47 (vùng chuyển màng thứ hai), các vị trí 62 đến 84 (vùng chuyển màng thứ ba), các vị trí 86 đến 108 (vùng chuyển màng thứ tư), và các vị trí 110 đến 132 (vùng chuyển màng thứ năm) của protein *YggB* kiểu đại. Sự đột biến ở vùng chuyển màng là sự đột biến ở các vùng mã hóa cho các vùng chuyển màng này của gen *yggB* kiểu đại. Sự đột biến ở vùng chuyển màng có thể

được đưa vào trong một hoặc nhiều vị trí trong các vùng này. Sự đột biến ở vùng chuyển màng tốt hơn là sự đột biến mà gây ra sự thể đoạn, sự khuyết đoạn, sự thêm đoạn, sự xen đoạn, hoặc sự đảo đoạn của một hoặc vài gốc axit amin, nhưng không bao gồm bất kỳ sự đột biến dịch khung hoặc sự đột biến vô nghĩa. Số lượng theo thuật ngữ "một hoặc vài" tốt hơn là từ 1 đến 20, tốt hơn nữa là từ 1 đến 10, vẫn tốt hơn nữa là từ 1 đến 5, tốt nhất là từ 1 đến 3. Các ví dụ về sự đột biến trong vùng chuyển màng bao gồm sự đột biến mà xen một hoặc vài gốc axit amin, như Cys-Ser-Leu, vào giữa gốc leuxin ở vị trí 14 và gốc tryptophan ở vị trí 15; sự đột biến mà thay thế gốc alanin ở vị trí 100 bằng gốc axit amin khác như gốc axit amin có nhóm hydroxyl ở mạch bên (tức là, Thr, Ser, hoặc Tyr), tốt hơn là gốc Thr; sự đột biến mà thay thế gốc alanin ở vị trí 111 bằng gốc axit amin khác như gốc axit amin có nhóm hydroxyl ở mạch bên (tức là Thr, Ser, hoặc Tyr), tốt hơn là gốc Thr; trong protein YggB kiểu dại

Trong sáng chế, "gốc axit amin ở vị trí X của protein YggB kiểu dại" có nghĩa là gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin của vị trí X trong SEQ ID NO: 10, trừ phi được quy định khác. "Vị trí X" trong trình tự axit amin là vị trí thứ X-th tính từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin, và gốc axit amin của đầu tận cùng N là gốc axit amin ở vị trí 1. Nghĩa là, các vị trí nêu trên của gốc axit amin cho biết các vị trí tương ứng, và các vị trí xác thực của nó có thể thay đổi do sự khuyết đoạn, sự xen đoạn, sự thêm đoạn, hoặc tương tự của gốc axit amin hoặc các gốc axit amin. Ví dụ, "gốc axit amin ở vị trí 419 của protein YggB kiểu dại" có nghĩa là gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin của vị trí 419 trong SEQ ID NO: 10, và khi một gốc axit amin được loại bỏ ở vị trí ở phía đầu tận cùng N của vị trí 419, gốc axit amin thứ 418 từ đầu tận cùng N là "gốc axit amin ở vị trí 419 của protein YggB kiểu dại". Hơn nữa, khi một gốc axit amin được xen vào vị trí ở phía đầu tận cùng N của vị trí 419, gốc axit amin thứ 420 từ đầu tận cùng N là "gốc axit amin ở vị trí 419 của protein YggB kiểu dại". Cụ thể, ví dụ, gốc axit amin của các vị trí 419 đến 529 của protein *YggB* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14967 tương ứng với gốc axit amin của các vị trí 419 đến 533 của protein YggB kiểu dại.

Gốc axit amin mà là "gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin của vị

trí X trong SEQ ID NO: 10" trong trình tự axit amin của protein *YggB* bất kỳ có thể được xác định bằng cách so sánh trình tự giữa trình tự axit amin của protein *YggB* bất kỳ với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10. Sự so sánh trình tự có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, sử dụng phần mềm phân tích gen đã biết. Các ví dụ cụ thể về phần mềm như vậy bao gồm DNASIS do Hitachi Solutions sản xuất, GENETYX do Genetyx sản xuất, và tương tự (Elizabeth C. Tyler et al., Computers and Biomedical Research, 24 (1) 72-96, 1991; Barton GJ et al., Journal of Molecular Biology, 198 (2), 327-37, 1987).

Gen *yggB* đột biến có thể thu được bằng cách cải biến gen *yggB* kiểu dại để có "sự đột biến đặc hiệu" nêu trên. Sự cải biến ADN có thể được tiến hành bằng phương pháp đã biết. Ví dụ, sự đột biến đích có thể được đưa vào trong vị trí mong muốn của ADN nhờ phương pháp đột biến điểm đặc hiệu. Các ví dụ cụ thể về phương pháp đột biến điểm đặc hiệu bao gồm, ví dụ, phương pháp sử dụng PCR (Higuchi, R., 61, in PCR Technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton Press, 1989; Carter P., Meth. In Enzymol., 154, 382, 1987), và phương pháp sử dụng thể thực khuẩn (Kramer, W. và Frits, H.J., Meth. in Enzymol., 154, 350, 1987; Kunkel, T.A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367, 1987). Hơn nữa, gen *yggB* đột biến cũng có thể thu được bằng quá trình tổng hợp hóa học.

Sự cải biến vi khuẩn mà vi khuẩn có gen *yggB* đột biến có thể đạt được bằng cách đưa gen *yggB* đột biến vào trong vi khuẩn. Sự cải biến vi khuẩn mà vi khuẩn có gen *yggB* đột biến cũng có thể đạt được bằng cách đưa sự đột biến vào trong gen *yggB* của vi khuẩn nhờ sự đột biến tự nhiên hoặc quá trình xử lý bằng tác nhân gây đột biến.

Các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic cũng có thể được truyền truyền hoặc gia tăng hữu hiệu khả năng sản xuất các axit L-amin mà được sinh tổng hợp nhờ axit L-glutamic làm hợp chất trung gian, như L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-xitrulin, và L-ornitin. Vì vậy, vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin bất kỳ trong số các axit L-amin này mà được sinh tổng hợp nhờ axit L-glutamic có thể có đặc tính vốn có của vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic như nêu trên, nếu cần. Ví dụ, vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin bất kỳ trong số các axit L-amin này mà được sinh tổng hợp nhờ axit L-

glutamic có thể đã được cải biến sao cho hoạt tính của α -ketoglutarat dehydrogenaza và/hoặc succinat dehydrogenaza được giảm.

<Vi khuẩn sản xuất L-glutamin>

Các ví dụ về phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-glutamin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-glutamin được gia tăng. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, glutamat dehydrogenaza (*gdhA*) và glutamin synthetaza (*glnA*). Hoạt tính glutamin synthetaza cũng có thể được gia tăng bằng cách làm đứt gãy gen glutamin adenylyltransferaza (*glnE*) hoặc làm đứt gãy gen protein điều khiển PII (*glnB*) (EP1229121).

Các ví dụ về phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-glutamin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym mà xúc tác phản ứng tách ra từ chu trình sinh tổng hợp L-glutamin để tạo ra hợp chất không phải là L-glutamin được giảm. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, glutaminaza.

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-glutamin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính hoặc các hoạt tính của glutamat dehydrogenaza (*gdhA*) và/hoặc glutamin synthetaza (*glnA*) (EP1229121, EP1424398) được gia tăng, và vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính glutaminaza (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2004-187684) được giảm. Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-glutamin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm chủng thuộc giống *Escherichia* và có glutamin synthetaza đột biến trong đó gốc tyrosin ở vị trí 397 của glutamin synthetaza đã được thay thế bằng gốc axit amin khác (US2003/0148474A).

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-glutamin cho hoặc trong vi khuẩn coryneform còn bao gồm phương pháp truyền tính kháng 6-diazo-5-oxo-norleuxin (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 3-232497), phương pháp truyền tính kháng chất đồng đẳng purin và tính kháng methionin sulfoxit (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa

xét nghiệm (Kokai) số 61-202694), và phương pháp truyền tính kháng axit α -ketomalonic (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-151495). Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-glutamin bao gồm, ví dụ, các chủng sau đây.

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11573 (FERM P-5492, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-151495)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11576 (FERM BP-10381, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-151495)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ12212 (FERM P-8123, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 61-202694)

<Vi khuẩn sản xuất L-prolin>

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-prolin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-prolin. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm glutamat-5-kinaza (*proB*), γ -glutamylphosphat reductaza, và pyrolin-5-carboxylat reductaza (*putA*). Để gia tăng hoạt tính của enzym này, ví dụ, gen *proB* mã hóa glutamat kinaza được khử nhảy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-prolin (patent Đức số 3127361) có thể được ưu tiên sử dụng.

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-prolin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự giảm hoạt tính của enzym liên quan đến sự phân hủy L-prolin. Các ví dụ về enzym này bao gồm prolin dehydrogenaza và ornitin aminotransferaza.

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-prolin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, *E. coli* NRRL B-12403 và NRRL B-12404 (patent Anh số 2075056), *E. coli* VKPM B-8012 (đơn yêu cầu cấp patent Nga số 2000124295), các chủng đột biến plasmit *E. coli* được đề cập trong patent Đức

số 3127361, các chủng đột biến plasmit *E. coli* được được trong Bloom F.R. et al. (The 15th Miami winter symposium, 1983, p. 34), chủng *E. coli* 702 (VKPM B-8011) là chủng kháng 3,4-dehydroxyprolin và azetidin-2-carboxylat, và chủng *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012) là chủng khuyết gen *ilvA* của chủng 702 (EP1172433).

<Vi khuẩn sản xuất L-threonin>

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-threonin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-threonin. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, aspartokinaza III (*lysC*), aspartat semialdehyt dehydrogenaza (*asd*), aspartokinaza I (*thrA*), homoserin kinaza (*thrB*), threonin syntaza (*thrC*), và aspartat aminotransferaza (aspartat transaminaza) (*aspC*). Trong số các enzym này, tốt hơn là tăng cường hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ aspartokinaza III, aspartat semialdehyt dehydrogenaza, aspartokinaza I, homoserin kinaza, aspartat aminotransferaza, và threonin syntaza. Gen bất kỳ trong số các gen mã hóa các enzym sinh tổng hợp L-threonin có thể được đưa vào trong vi khuẩn có sự giảm khả năng phân hủy threonin. Các ví dụ về chủng trong đó sự phân hủy threonin được kìm hãm bao gồm, ví dụ, chủng *E. coli* TDH6 là chủng không có hoạt tính threonin dehydrogenaza (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2001-346578).

Các hoạt tính của các enzym sinh tổng hợp L-threonin được ức chế bằng sản phẩm cuối, L-threonin. Do vậy, để tạo ra chủng sản xuất L-threonin, tốt hơn là các gen của các enzym sinh tổng hợp L-threonin được cải biến sao cho các enzym này được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-threonin. Các gen *thrA*, *thrB*, và *thrC* nêu trên tạo thành operon threonin, mà tạo ra cấu trúc suy giảm. Mức biểu hiện của operon threonin được ức chế bởi isoleuxin và threonin trong dịch nuôi cấy và cũng được ức chế bởi sự suy giảm. Do vậy, mức biểu hiện của operon threonin có thể được gia tăng bằng cách loại bỏ trình tự dẫn đầu hoặc đoạn suy giảm trong vùng suy giảm (Lynn, S.P., Burton, W.S., Donohue, T.J.,

Gould, R.M., Gumport, R.L, and Gardner, J.F., J. Mol. Biol. 194:59-69 (1987); WO02/26993; WO2005/049808; và WO2003/097839).

Đoạn khởi đầu nguyên thể của operon threonin có mặt ở dòng trên của operon threonin, và có thể được thay thế bằng đoạn khởi đầu không nguyên thể (WO98/04715). Ngoài ra, operon threonin có thể được tạo ra sao cho các gen sinh tổng hợp threonin được biểu hiện trong điều kiện kiểm soát gen ức chế và đoạn khởi đầu của thể thực khuẩn λ (EP0593792B). Hơn nữa, vi khuẩn được cải biến sao cho nó được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-threonin cũng có thể thu được bằng cách chọn chủng kháng axit α -amino- β -hydroxyisovaleric (AHV), là chất đồng đẳng của L-threonin.

Tốt hơn là, mức biểu hiện của operon threonin mà được cải biến để được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-threonin như được mô tả ở trên được gia tăng ở vật chủ bằng cách gia tăng số lượng bản sao của nó hoặc bằng cách gắn nó vào đoạn khởi đầu tiềm năng. Số lượng bản sao có thể được gia tăng bằng cách đưa plasmid chứa operon threonin vào trong vật chủ. Số lượng bản sao cũng có thể được gia tăng bằng cách chuyển operon threonin đến hệ gen của vật chủ bằng cách sử dụng gen nhảy, thể thực khuẩn Mu, hoặc tương tự.

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-threonin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp truyền tính kháng L-threonin cho vật chủ, và phương pháp truyền tính kháng L-homoserin cho vật chủ. Tính kháng có thể được truyền bằng cách, ví dụ, gia tăng mức biểu hiện của gen mà truyền tính kháng L-threonin hoặc gen mà truyền tính kháng L-homoserin. Các ví dụ về các gen mà truyền tính kháng nêu trên bao gồm gen *rhtA* (Res. Microbiol. 154:123-135 (2003)), gen *rhtB* (EP0994190A), gen *rhtC* (EP1013765A), gen *yfiK*, và gen *yeaS* (EP1016710A). Về các phương pháp truyền tính kháng L-threonin cho vật chủ, các phương pháp được đề cập trong EP0994190A và WO90/04636 có thể được kể đến.

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-threonin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, *E. coli* TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996, các patent Mỹ số 5,175,107 và 5,705,371), *E. coli* 472T23/pYN7 (ATCC 98081, patent Mỹ số 5,631,157), *E. coli* NRRL-21593 (patent Mỹ số 5,939,307), *E. coli*

FERM BP-3756 (patent Mỹ số 5,474,918), *E. coli* FERM BP-3519 và FERM BP-3520 (patent Mỹ số 5,376,538), *E. coli* MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (in Russian), 14, 947-956 (1978)), *E. coli* VL643 và VL2055 (EP1149911A), và *E. coli* VKPM B-5318 (EP0593792B).

Chủng VKPM B-3996 là chủng thu được bằng cách đưa plasmit pVIC40 vào trong chủng TDH-6. Chủng TDH-6 có khả năng đồng hóa sucroza và khuyết gen *thrC*, và gen *ilvA* của nó có sự đột biến rò. Chủng TDH-6 cũng có sự đột biến ở gen *rhtA*, mà truyền tính kháng đối với nồng độ cao của threonin hoặc homoserin. Plasmit pVIC40 là plasmit thu được bằng cách xen operon *thrA*BC* chứa gen *thrA* đột biến mã hóa aspartokinaza-homoserin dehydrogenaza I chống lại sự ức chế phản hồi bởi threonin và các gen *thrBC* kiểu dại vào trong vật truyền bắt nguồn từ RSF1010 (patent Mỹ số 5,705,371). Gen *thrA* đột biến mã hóa aspartokinaza-homoserin dehydrogenaza I mà về cơ bản được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi threonin. Chủng B-3996 được lưu giữ ngày 19 tháng 11 năm 1987 ở All-Union Scientific Center of Antibiotics (Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Russia) với số truy cập RIA 1867. Chủng này cũng được lưu giữ ở Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) ngày 7 tháng 4 năm 1987 với số truy cập VKPM B-3996.

Chủng VKPM B-5318 nguyên dưỡng đối với isoleuxin, và mang plasmit pPRT614, tương ứng với plasmit pVIC40 mà có vùng điều hòa của operon threonin được thay thế bằng gen ức chế Cl thể thực khuẩn λ miễn cảm nhiệt độ và đoạn khởi đầu PR. Chủng VKPM B-5318 được lưu giữ ở Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) ngày 3 tháng 5 năm 1990 với số truy cập VKPM B-5318.

Gen *thrA* mà mã hóa aspartokinaza-homoserin dehydrogenaza I của *E. coli* đã được giải thích (số nucleotit từ 337 đến 2799, số truy cập GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). Gen *thrA* được xác định giữa các gen *thrL* và *thrB* trên nhiễm sắc thể của *E. coli* K-12. Gen *thrB* mà mã hóa homoserin kinaza của *Escherichia coli* đã được giải thích (số nucleotit từ 2801 đến 3733, số truy cập

GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). Gen *thrB* được xác định nằm giữa các gen *thrA* và *thrC* trên nhiễm sắc thể của *E. coli* K-12. Gen *thrC* mã hóa threonin syntaza của *E. coli* đã được giải thích (số nucleotit từ 3734 đến 5020, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990). Gen *thrC* được xác định nằm giữa gen *thrB* và khung đọc mở *yaaX* trên nhiễm sắc thể của *E. coli* K-12. Operon *thrA*BC* chứa gen *thrA* đột biến mã hóa aspartokinaza-homoserin dehydrogenaza I kháng sự ức chế phản hồi bởi threonin và các gen *thrBC* kiểu dại có thể thu được từ plasmit pVIC40 đã biết, plasmit này có trong chủng *E. coli* sản xuất threonin VKPM B-3996 (patent Mỹ số 5,705,371).

Gen *rhtA* của *E. coli* được xác định ở 18 min trên nhiễm sắc thể *E. coli* gần với operon *glnHPQ*, mã hóa các thành phần của hệ vận chuyển glutamin. Gen *rhtA* là giống với ORF1 (gen *ybiF*, số nucleotit từ 764 đến 1651, số truy cập GenBank AAA218541, gi:440181) và nằm giữa các gen *pexB* và *ompX*. Đơn vị biểu hiện protein được mã hóa bởi ORF1 đã được chỉ rõ là gen *rhtA* (rht: kháng homoserin và threonin). Cũng đã thấy rằng sự đột biến *rhtA23* mà truyền tính kháng nồng độ cao của threonin hoặc homoserin là sự thay thế A cho G ở vị trí -1 so với codon khởi đầu ATG (ABSTRACTS of the 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, abstract No. 457; EP1013765A).

Gen *asd* của *E. coli* đã được giải thích (số nucleotit từ 3572511 đến 3571408, số truy cập GenBank NC_000913.1, gi:16131307), và có thể thu được bằng quá trình PCR (White, T.J., et al., Trends Genet, 5:185-189, 1989) sử dụng các đoạn môi được tạo ra trên cơ sở trình tự nucleotit của gen. Các gen *asd* của các vi sinh vật khác cũng có thể thu được theo cách tương tự.

Gen *aspC* của *E. coli* cũng đã được giải thích (số nucleotit từ 983742 đến 984932, số truy cập GenBank NC_000913.1, gi:16128895), và có thể thu được bằng quá trình PCR sử dụng các đoạn môi được tạo ra trên cơ sở trình tự nucleotit của gen này. Các gen *aspC* của các vi sinh vật khác cũng có thể thu được theo cách tương tự.

Hơn nữa, các ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-

threonin bao gồm, ví dụ, *Corynebacterium acetoacidophilum* AJ12318 (FERM BP-1172, patent Mỹ số 5,188,949).

<Vi khuẩn sản xuất L-lysine>

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-lysine bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-lysine. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, dihydrodipicolinate syntaza (*dapA*), aspartokinase III (*lysC*), dihydrodipicolinate reductase (*dapB*), diaminopimelate decarboxylase (*lysA*), diaminopimelate dehydrogenase (*ddh*) (patent Mỹ số 6,040,160), phosphoenolpyruvate carboxylase (*ppc*), aspartate semialdehyde dehydrogenase (*asd*), aspartate aminotransferase (aspartate transaminase) (*aspC*), diaminopimelate epimerase (*dapF*), tetrahydrodipicolinate succinylase (*dapD*), succinyl diaminopimelate deacetylase (*dapE*), và aspartase (*aspA*) (EP1253195A). Tốt hơn là, gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ, ví dụ, dihydrodipicolinate reductase, diaminopimelate decarboxylase, diaminopimelate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, aspartate aminotransferase, diaminopimelate epimerase, aspartate semialdehyde dehydrogenase, tetrahydrodipicolinate succinylase, và succinyl diaminopimelate deacetylase, trong số các enzym này. Hơn nữa, vi khuẩn sản xuất L-lysine và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng có thể biểu hiện mức gia tăng của gen liên quan đến hiệu quả năng lượng (*cyo*) (EP1170376A), gen mã hóa nicotinamide nucleotide transhydrogenase (*pntAB*) (patent Mỹ số 5,830,716), gen *ybjE* (WO2005/073390), hoặc dạng kết hợp của các gen này. Vì aspartokinase III (*lysC*) được đem đi xử lý ức chế phản hồi bởi L-lysine, gen *lysC* đột biến mã hóa aspartokinase III được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-lysine (patent Mỹ số 5,932,453) có thể được sử dụng để gia tăng hoạt tính của enzym này. Các ví dụ về aspartokinase III được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-lysine bao gồm aspartokinase III thu được từ *Escherichia coli* và có một hoặc nhiều sự đột biến được chọn từ sự đột biến để thay thế gốc methionine ở vị trí 318 bằng gốc isoleucine; sự đột biến để thay thế gốc glycine ở vị trí 323 bằng gốc axit

aspartic; và sự đột biến để thay thế gốc threonin ở vị trí 352 bằng gốc isoleuxin (các patent Mỹ số 5,661,012 và 6,040,160). Hơn nữa, vì dihydrodipicolinat syntaza (*dapA*) được đem đi xử lý ức chế phản hồi bởi L-lysin, gen *dapA* đột biến mã hóa dihydrodipicolinat syntaza được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-lysin có thể được sử dụng để gia tăng hoạt tính của enzym này. Các ví dụ về dihydrodipicolinat syntaza được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-lysin bao gồm dihydrodipicolinat syntaza thu được từ *Escherichia coli* và có sự đột biến để thay thế gốc histidin ở vị trí 118 bằng gốc tyrosin (patent Mỹ số 6,040,160).

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-lysin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự giảm hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym mà xúc tác phản ứng tách ra từ chu trình sinh tổng hợp L-lysin để tạo ra hợp chất khác với L-lysin. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, enzym homoserin dehydrogenaza, lysin decarboxylaza (patent Mỹ số 5,827,698), và malic (WO2005/010175).

Hơn nữa, các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-lysin cho hoặc trong vi khuẩn coryneform còn bao gồm phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho hoạt tính của hệ gây tiết lysin (*lysE*) được gia tăng (WO97/23597). Gen *lysE* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 tương ứng với trình tự bổ trợ cho trình tự có số nucleotit từ 1.329.712 đến 1.330.413 trong trình tự hệ gen được đăng kí số truy cập Genbank NC_006958 (VERSION NC_006958.1 GI:62388892) theo cơ sở dữ liệu NCBI. Protein LysE của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 được đăng kí số truy cập Genbank YP_225551 (YP_225551.1 GI:62390149).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-lysin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm các chủng đột biến có tính kháng chất đồng đẳng L-lysin. Các chất đồng đẳng L-lysin ức chế sự phát triển của vi khuẩn như vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* và vi khuẩn coryneform, nhưng sự ức chế này được giải phóng hoàn toàn hoặc một phần khi có mặt L-lysin trong môi trường. Các ví dụ về các chất đồng đẳng L-lysin bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ

thể ở, oxalysin, lysin hydroxamat, S-(2-aminoethyl)-L-xystein (AEC), γ -methyllysine, và α -clocaprolactam. Các chủng đột biến có tính kháng các chất đồng đẳng lysine này có thể thu được bằng cách xử lý vi khuẩn bằng tác nhân gây đột biến nhân tạo thông thường.

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-lysine và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm *E. coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185, patent Mỹ số 4,346,170) và *E. coli* VL611. Trong các chủng này, aspartokinase được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-lysine.

Các ví dụ cụ thể về L-lysine-vi khuẩn sản xuất và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm chủng *E. coli* WC196. Chủng WC196 được nhân giống bằng cách truyền tính kháng AEC cho chủng W3110, chủng này thu được từ *E. coli* K-12 (patent Mỹ số 5,827,698). Chủng WC196 được xác định là *E. coli* AJ13069 và được lưu giữ ở National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (nay là cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) ngày 6 tháng 12 năm 1994 và được đăng ký số truy cập FERM P-14690. Sau đó, mẫu lưu giữ này được chuyển thành mẫu lưu giữ quốc tế dưới các điều khoản của Hiệp ước Budapest ngày 29 tháng 9 năm 1995, và được đăng ký số truy cập FERM BP-5252 (patent Mỹ số 5,827,698).

Các ví dụ ưu tiên về vi khuẩn sản xuất L-lysine bao gồm *E. coli* WC196 Δ cadA Δ ldc và *E. coli* WC196 Δ cadA Δ ldc/pCABD2 (WO2010/061890). *E. coli* WC196 Δ cadA Δ ldc là chủng được tạo ra từ chủng WC196 bằng cách làm đứt gãy các gen *cadA* và *ldcC* mã hóa lysine decarboxylase. Chủng WC196 Δ cadA Δ ldc/pCABD2 được tạo ra bằng cách đưa plasmid pCABD2 chứa các gen chứa enzyme sinh tổng hợp lysine (patent Mỹ số 6,040,160) vào trong chủng WC196 Δ cadA Δ ldc. Chủng WC196 Δ cadA Δ ldc, được xác định là AJ110692, được lưu giữ ở cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (nay là cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8

Kazusakamatar, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) ngày 7 tháng 10 năm 2008 dưới dạng lưu giữ quốc tế, và được đăng kí số truy cập FERM BP-11027. Plasmid pCABD2 chứa gen *dapA* đột biến thu được từ *Escherichia coli* và mã hóa dihydrodipicolinat syntaza (DDPS) có sự đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-lysin (H118Y), gen *lysC* đột biến thu được từ *Escherichia coli* và mã hóa aspartokinaza III có sự đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-lysin (T352I), gen *dapB* thu được từ *Escherichia coli* và mã hóa dihydrodipicolinat reductaza, và gen *ddh* thu được từ *Brevibacterium lactofermentum* và mã hóa diaminopimelat dehydrogenaza.

Các ví dụ ưu tiên về vi khuẩn sản xuất L-lysin còn bao gồm *E. coli* AJIK01 (NITE BP-01520). Chủng AJIK01 được xác định là *E. coli* AJ111046, và được lưu giữ ở cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depositary (#122, 2-5-8 Kazusakamatar, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) ngày 29 tháng 1 năm 2013. Sau đó, mẫu này được chuyển thành lưu giữ quốc tế dưới các điều khoản của Hiệp ước Budapest ngày 15 tháng 5 năm 2014, và được đăng kí số truy cập NITE BP-01520.

Các ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản sinh L-lysin bao gồm, ví dụ, các chủng đột biến kháng AEC (chủng *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum* AJ11082) (NRRL B-11470) v.v., các công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokoku) số 56-1914, 56-1915, 57-14157, 57-14158, 57-30474, 58-10075, 59-4993, 61-35840, 62-24074, 62-36673, 5-11958, 7-112437, và 7-112438); các chủng đột biến có nhu cầu axit amin như L-homoserin cho sự sinh trưởng (các công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 48-28078 và 56-6499); các chủng đột biến thể hiện tính kháng AEC và có nhu cầu axit amin như L-leuxin, L-homoserin, L-prolin, L-serin, L-arginin, L-alanin, và L-valin (các patent Mỹ số 3,708,395 và 3,825,472); các chủng đột biến thể hiện tính kháng DL- α -amino- ϵ -caprolactam, α -amino-lauryllactam, chất đồng đẳng axit aspartic, thuốc sulfa, quinoit, và N-lauroylleuxin; các chủng đột biến thể hiện tính kháng tác nhân ức chế oxaloacetat decarboxylaza hoặc tác nhân ức chế enzym chuỗi hô hấp (các đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm

(Kokai) số 50-53588, 50-31093, 52-102498, 53-9394, 53-86089, 55-9783, 55-9759, 56-32995, 56-39778, các công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 53-43591 và 53-1833); các chủng đột biến có nhu cầu inositol hoặc axit axetic (các đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 55-9784 và 56-8692); các chủng đột biến mà miễn cảm với axit flopyruvic hoặc nhiệt độ bằng hoặc cao hơn 34°C (các đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 55-9783 và 53-86090); và các chủng đột biến thể hiện tính kháng etylen glycol (patent Mỹ số 4,411,997).

<Vi khuẩn sản xuất L-arginin >

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-arginin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-arginin. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, N-axetylglutamat syntaza (*argA*), N-axetylglutamat kinaza (*argB*), N-axetylglutamyl phosphat reductaza (*argC*), axetylnitrit transaminaza (*argD*), axetylnitrit deaxetylaza (*argE*), ornitin carbamoyl transferaza (*argF*, *argI*), argininosuccinat synthetaza (*argG*), argininosuccinat lyaza (*argH*), ornitin axetyl transferaza (*argJ*), và carbamoyl phosphat synthetaza (*carAB*). Để làm gen N-axetylglutamat syntaza (*argA*), ví dụ, gen mã hóa N-axetylglutamat syntaza đột biến được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-arginin bằng sự thay thế cho gốc axit amin tương ứng với các vị trí 15 đến 19 của enzym kiểu đại (EP1170361A) có thể được ưu tiên sử dụng.

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-arginin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, chủng *E. coli* 237 (VKPM B-7925, US2002/058315A1), các chủng có nguồn gốc từ vi khuẩn này được đưa vào với gen *argA* mã hóa N-axetyl glutamat syntaza đột biến (đơn yêu cầu cấp patent Nga số 2001112869, EP1170361A1), chủng *E. coli* 382 thu được từ chủng 237 và có khả năng đồng hóa axit axetic được cải thiện (VKPM B-7926, EP1170358A1), và chủng *E. coli* 382ilvA+, là chủng thu được từ chủng 382 bằng cách đưa gen *ilvA* kiểu đại từ chủng *E. coli* K-12 vào. Chủng *E. coli* 237 được lưu giữ ở Russian National Collection of Industrial Microorganisms

(VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) ngày 10 tháng 4 năm 2000 dưới số truy cập VKPM B-7925, và mẫu lưu giữ này được chuyển thành mẫu lưu giữ quốc tế dưới các điều khoản của Hiệp ước Budapest ngày 18 tháng 5 năm 2001. Chủng *E. coli* 382 được lưu giữ ở Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) ngày 10 tháng 4 năm 2000 với số truy cập VKPM B-7926.

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-arginin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm các chủng có tính kháng các chất đồng đẳng axit amin, và v.v.. Các ví dụ về các chủng như vậy bao gồm các chủng đột biến *E. coli* có tính kháng α -methylmethionin, p-flophenylalanin, D-arginin, arginin hydroxamat, S-(2-aminoethyl)-xystein, α -methylserin, β -2-thienylalanin, hoặc sulfaguanidin (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-106598).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-arginin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm vi khuẩn coryneform làm chủng khuyết ArgR, là gen ức chế arginin (US2002-0045223A), và chủng trong đó hoạt tính glutamin synthetaza được gia tăng (US2005-0014236A).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-arginin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm các chủng đột biến của vi khuẩn coryneform, các chủng đột biến có tính kháng chất đồng đẳng axit amin hoặc tương tự. Các ví dụ về các chủng như vậy bao gồm, ví dụ, các chủng có tính kháng 2-thiazolealanin và còn thể hiện tính khuyết dưỡng đối với L-histidin, L-prolin, L-threonin, L-isoleuxin, L-methionin, hoặc L-tryptophan (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 54-44096); các chủng kháng axit ketomalonic, axit flomalonic, hoặc axit monofloaxetic (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 57-18989); các chủng kháng argininol (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản No. 62-24075); các chủng kháng X-guanidin (X là mạch béo hoặc dẫn xuất của nó, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2-186995); và các chủng kháng arginin hydroxamat và 6-azauraxil (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 57-150381). Các ví dụ cụ thể về chủng coryneform có khả năng sản xuất L-arginin bao gồm các

chúng sau đây.

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11169 (FERM BP-6892)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12092 (FERM BP-6906)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11336 (FERM BP-6893)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11345 (FERM BP-6894)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12430 (FERM BP-2228)

<Vi khuẩn sản xuất L-xitrulin và vi khuẩn sản xuất L-ornitin>

L-xitrulin và L-ornitin là các hợp chất trung gian của chu trình sinh tổng hợp L-arginin. Do vậy, các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-xitrulin và/hoặc L-ornitin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-arginin. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, N-axetylglutamat syntaza (*argA*), N-axetylglutamat kinaza (*argB*), N-axetylglutamyl phosphat reductaza (*argC*), axetylornitin transaminaza (*argD*), axetylornitin deaxetylaza (*argE*), ornitin carbamoyl transferaza (*argF*, *argI*), ornitin axetyl transferaza (*argJ*), và carbamoyl phosphat synthetaza (*carAB*), đối với L-xitrulin. Hơn nữa, các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, N-axetylglutamat syntaza (*argA*), N-axetylglutamat kinaza (*argB*), N-axetylglutamyl phosphat reductaza (*argC*), axetylornitin transaminaza (*argD*), axetylornitin deaxetylaza (*argE*), và ornitin axetyl transferaza (*argJ*), đối với L-ornitin.

Vi khuẩn sản xuất L-xitrulin có thể thu được dễ dàng từ, ví dụ, vi khuẩn L-arginin như chủng *E. coli* 382 (VKPM B-7926) bằng cách giảm hoạt tính của argininosuccinat synthetaza được mã hóa bởi gen *argG*. Ngoài ra, vi khuẩn sản

xuất L-ornitin có thể thu được dễ dàng từ, ví dụ, vi khuẩn L-arginin như chủng *E. coli* 382 (VKPM B-7926) bằng cách giảm hoạt tính của ornitin carbamoyl transferaza được mã hóa bởi các gen *argF* và *argI*.

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-xitrulin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, các chủng thuộc giống *Escherichia*, như các chủng *E. coli* 237/pMADS11, 237/pMADS12, và 237/pMADS13, các chủng này có N-axetylglutamat syntaza đột biến (patent Nga số 2,215,783, patent Mỹ số 6,790,647, và EP1170361B1), các chủng *E. coli* 333 (VKPM B-8084) và 374 (VKPM B-8086), các chủng này có carbamoyl phosphat synthetaza kháng sự ức chế phản hồi (patent Nga số 2,264,459), các chủng *E. coli* có sự gia tăng hoạt tính α -ketoglutarat syntaza và có sự cải biến hoạt tính của ferredoxin NADP⁺ reductaza, pyruvat syntaza, và/hoặc α -ketoglutarat dehydrogenaza (EP2133417A); và chủng *P. ananatis* NA1sucAsdhA mà có sự giảm hoạt tính của succinat dehydrogenaza và α -ketoglutarat dehydrogenaza (US2009-286290A1).

<Vi khuẩn sản xuất L-histidin>

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-histidin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-histidin. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, ATP phosphoribosyltransferaza (*hisG*), phosphoribosyl AMP xyclohydrolaza (*hisI*), phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolaza (*hisI*), phosphoribosylformimino-5-aminoimidazol carboxamit ribotit isomeraza (*hisA*), amidotransferaza (*hisH*), histidinol phosphat aminotransferaza (*hisC*), histidinol phosphataza (*hisB*), và histidinol dehydrogenaza (*hisD*).

Trong số các enzym này, các enzym sinh tổng hợp L-histidin được mã hóa bởi *hisG* và *hisBHAFI* được biết là được ức chế bởi L-histidin. Do vậy, khả năng sản xuất L-histidin có thể được truyền hoặc gia tăng bằng cách, ví dụ, đưa sự đột biến để tạo ra tính kháng đối với sự ức chế phản hồi vào trong gen mã hóa ATP phosphoribosyltransferaza (*hisG*) (các patent Nga số 2,003,677 và

2,119,536).

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-histidin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, các chủng thuộc giống *Escherichia*, như chủng *E. coli* 24 (VKPM B-5945, RU2003677), *E. coli* NRRL B-12116 đến B-12121 (patent Mỹ số 4,388,405), *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675) và H-9343 (FERM BP-6676, patent Mỹ số 6,344,347), *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674, EP1085087), *E. coli* AI80/pFM201 (patent Mỹ số 6,258,554), *E. coli* FERM P-5038 và FERM P-5048, mà đã được đưa vào với vật truyền mang ADN mã hóa enzym sinh tổng hợp L-histidin (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 56-005099), các chủng *E. coli* được đưa gen vận chuyển axit amin vào (EP1016710A), và chủng *E. coli* 80 mà đã được truyền tính kháng sulfaguanidin, DL-1,2,4-triazol-3-alanin, và streptomycin (VKPM B-7270, patent Nga số 2119536).

<Vi khuẩn sản xuất L-xystein >

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-xystein bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-xystein. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, serin axetyltransferaza (*cysE*) và 3-phosphoglyxerat dehydrogenaza (*serA*). Hoạt tính serin axetyltransferaza có thể được gia tăng bằng cách, ví dụ, đưa gen *cysE* đột biến mã hóa serin axetyltransferaza đột biến kháng sự ức chế phản hồi bởi xystein vào trong vi khuẩn. Serin axetyltransferaza đột biến được đề cập trong, ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 11-155571 và US2005-0112731A. Hơn nữa, hoạt tính 3-phosphoglyxerat dehydrogenaza có thể được gia tăng bằng cách, ví dụ, đưa gen *serA* đột biến mã hóa 3-phosphoglyxerat dehydrogenaza đột biến kháng sự ức chế phản hồi bởi serin vào trong vi khuẩn. 3-phosphoglyxerat dehydrogenaza đột biến này được đề cập trong, ví dụ, patent Mỹ số 6,180,373.

Hơn nữa, các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-xystein còn bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi

khuẩn có sự giảm hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym mà xúc tác phản ứng tách ra từ chu trình sinh tổng hợp L-xystein để tạo ra hợp chất khác với L-xystein. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, ví dụ, các enzym liên quan đến sự phân hủy L-xystein. Các ví dụ về các enzym liên quan đến sự phân hủy L-xystein bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, xystathionin- β -lyaza (*metC*, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 11-155571; Chandra et al., Biochemistry, 21 (1982) 3064-3069), tryptophanaza (*tnaA*, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2003-169668; Austin Newton et al., J. Biol. Chem., 240 (1965) 1211-1218), O-axetylserin sulfhydrylaza B (*cysM*, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2005-245311), sản phẩm gen *malY* (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2005-245311), sản phẩm gen *d0191* của *Pantoea ananatis* (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2009-232844), và xystein desulfhydraza (*aecD*, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2002-233384).

Hơn nữa, các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-xystein còn bao gồm, ví dụ, phương pháp gia tăng hệ gây tiết L-xystein, và phương pháp gia tăng hệ vận chuyển sulfat/thiosulfat. Các ví dụ về các protein của hệ gây tiết L-xystein bao gồm protein được mã hóa bởi gen *ydeD* (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2002-233384), protein được mã hóa bởi gen *yfiK* (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2004-49237), các protein được mã hóa bởi các gen *emrAB*, *emrKY*, *yoiIH*, *acrEF*, *bcr*, và *cusA* (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2005-287333), và protein được mã hóa bởi gen *yeaS* (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2010-187552). Các ví dụ về các protein của hệ vận chuyển sulfat/thiosulfat bao gồm các protein được mã hóa bởi cụm gen *cysPTWAM*.

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-xystein và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, *E. coli* JM15 được biến nạp với các alen *cysE* khác nhau mã hóa các serin axetyltransferaza kháng ngược (patent Mỹ số 6,218,168, đơn yêu cầu cấp patent Nga 2003121601), *E. coli* W3110 có gen biểu hiện quá

mức mã hóa protein thích hợp cho sự tiết chất gây độc tế bào (patent Mỹ số 5,972,663), các chủng *E. coli* có sự giảm hoạt tính cysteine desulfohydrolase (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 11-155571), và *E. coli* W3110 có sự gia tăng hoạt tính của tác nhân điều hòa phiên mã dương tính cho regulon cysteine được mã hóa bởi gen *cysB* (WO01/27307A1).

Hơn nữa, các ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-cysteine bao gồm vi khuẩn coryneform có serine acetyltransferase được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-cysteine bằng cách đó thể hiện hoạt tính serine acetyltransferase nội bào được gia tăng (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2002-233384).

<Vi khuẩn sản xuất L-serin>

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-serine bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzyme được chọn từ các enzyme sinh tổng hợp L-serine. Các ví dụ về các enzyme như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, 3-phosphoglycerate dehydrogenase (*serA*), phosphoserine transaminase (*serC*), và phosphoserine phosphatase (*serB*) (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 11-253187). Hoạt tính 3-phosphoglycerate dehydrogenase có thể được gia tăng bằng cách, ví dụ, đưa gen *serA* đột biến mã hóa 3-phosphoglycerate dehydrogenase đột biến kháng sự ức chế phản hồi bởi L-serine vào trong vi khuẩn. 3-phosphoglycerate dehydrogenase đột biến được đề cập trong, ví dụ, patent Mỹ số 6,180,373.

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-serine và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, vi khuẩn coryneform kháng azaserin hoặc β -(2-thienyl)-DL-alanine và không có khả năng phân hủy L-serine (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 10-248588). Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform như vậy bao gồm, ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ13324 (FERM P-16128) kháng azaserin và không có khả năng phân hủy L-serine, và *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ13325 (FERM P-16129) kháng β -(2-thienyl)-DL-alanine và không có khả năng phân hủy L-serine (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm

(Kokai) số 10-248588).

<Vi khuẩn sản xuất L-methionin>

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-methionin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm các chủng khuyết dưỡng L-threonin và các chủng đột biến kháng norleuxin (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2000-139471). Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-methionin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm chủng chứa homoserin transsuccinylaza đột biến kháng sự ức chế phản hồi bởi L-methionin (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2000-139471, US2009-0029424A). Vì L-methionin được sinh tổng hợp nhờ L-xystein làm hợp chất trung gian, khả năng sản xuất L-methionin cũng có thể được cải thiện bằng cách gia tăng khả năng sản xuất L-xystein (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2000-139471, US2008-0311632A).

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-methionin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, *E. coli* AJ11539 (NRRL B-12399), *E. coli* AJ11540 (NRRL B-12400), *E. coli* AJ11541 (NRRL B-12401), *E. coli* AJ11542 (NRRL B-12402, patent Anh số 2075055), chủng *E. coli* 218 (VKPM B-8125, patent Nga số 2209248) và chủng 73 (VKPM B-8126, patent Nga số 2215782), kháng norleuxin là chất đồng đẳng của L-methionin, và *E. coli* AJ13425 (FERMP-16808, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2000-139471). Chủng AJ13425 là chủng khuyết dưỡng L-threonin thu được từ *E. coli* W3110, trong đó gen ức chế methionin được loại bỏ, hoạt tính S-adenosylmethionin synthetaza nội bào được giảm, và hoạt tính homoserin transsuccinylaza nội bào, hoạt tính xystathionin γ -syntaza, và hoạt tính aspartokinaza-homoserin dehydrogenaza II được gia tăng.

<Vi khuẩn sản xuất L-leuxin>

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-leuxin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-leuxin. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, các enzym được mã hóa bởi các gen

của operon *leuABCD*. Hơn nữa, để gia tăng hoạt tính của enzym, ví dụ, gen *leuA* đột biến mã hóa isopropyl maleat syntaza được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi L-leuxin (patent Mỹ số 6,403,342) có thể được ưu tiên sử dụng.

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-leuxin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, các chủng thuộc giống *Escherichia*, như các chủng *E. coli* kháng leuxin (ví dụ, chủng 57 (VKPM B-7386, patent Mỹ số 6,124,121)), các chủng *E. coli* kháng chất đồng đẳng leuxin như β -2-thienylalanin, 3-hydroxyleuxin, 4-azaleuxin, và 5,5,5-trifloleuxin (công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokoku) số 62-34397 và đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 8-70879), các chủng *E. coli* thu được bằng kỹ thuật xử lý gen được đề cập trong WO96/06926, và *E. coli* H-9068 (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 8-70879).

Các ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-leuxin bao gồm, ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ3718 (FERM P-2516) kháng 2-thiazol alanin và β -hydroxyleuxin và khuyết dưỡng đối với isoleuxin và methionin.

<Vi khuẩn sản xuất L-Isoleuxin>

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-isoleuxin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều các enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-isoleuxin. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, threonin deaminaza và axetohydroxy axit syntaza (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2-458, EP0356739A, patent Mỹ số 5,998,178).

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-isoleuxin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, các vi khuẩn *Escherichia* như các chủng đột biến có tính kháng 6-dimethylaminopurin (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 5-304969), các chủng đột biến có tính kháng chất đồng đẳng isoleuxin như thiaisoleuxin và isoleuxin hydroxamat, và các chủng đột biến có tính kháng chất đồng đẳng isoleuxin và còn có tính kháng DL-ethionin và/hoặc arginin hydroxamat (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm

(Kokai) số 5-130882).

Các ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-isoleuxin bao gồm, ví dụ, vi khuẩn coryneform trong đó gen *brnE* mã hóa protein gây tiết axit amin mạch nhánh được khuếch đại (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2001-169788), vi khuẩn coryneform mà được truyền khả năng sản xuất L-isoleuxin bằng cách dung hợp thể nguyên sinh với vi khuẩn sản xuất L-lysin (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 62-74293), vi khuẩn coryneform trong đó homoserin dehydrogenaza được gia tăng (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 62-91193), chủng kháng threonin hydroxamat (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) No 62-195293), chủng kháng axit α -ketomalonic (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 61-15695), chủng kháng metyllysin (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 61-15696), và *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ12149 (FERM BP-759, patent Mỹ số 4,656,135).

<Vi khuẩn sản xuất L-valin>

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-valin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-valin. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, các enzym được mã hóa bởi các gen của operon *ilvGMEDA* và các enzym được mã hóa bởi operon *ilvBNC*. Gen *ilvBN* mã hóa axetohydroxy axit syntaza, và gen *ilvC* mã hóa isomeroreductaza (WO00/50624). Các sự biểu hiện của operon *ilvGMEDA* và operon *ilvBNC* bị kìm hãm (bị giảm) bởi L-valin, L-isoleuxin, và/hoặc L-leuxin. Do vậy, để gia tăng hoạt tính của enzym này, tốt hơn là làm giảm sự kìm hãm mức biểu hiện của L-valin được tạo ra bằng cách loại bỏ hoặc cải biến vùng cần cho sự suy giảm. Hơn nữa, threonin deaminaza được mã hóa bởi gen *ilvA* là enzym xúc tác phản ứng khử amin của L-threonin thu lấy axit 2-ketobutyric, đây là giai đoạn giới hạn tốc độ của hệ sinh tổng hợp L-isoleuxin. Do vậy, để sản xuất L-valin, tốt hơn là gen *ilvA* bị làm đứt gãy chẳng hạn, và bằng cách đó hoạt tính threonin deaminaza

được giảm.

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-valin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự giảm hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym mà xúc tác phản ứng tách ra từ chu trình sinh tổng hợp L-valin để tạo ra hợp chất không phải L-valin. Các ví dụ về các enzym như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, threonin dehydratase liên quan đến sự tổng hợp L-leucine, và các enzym liên quan đến sự tổng hợp axit D-pantothenic (WO00/50624).

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-valin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, các chủng *E. coli* được cải biến để biểu hiện quá mức operon *ilvGMEDA* (patent Mỹ số 5,998,178).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-valin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm các chủng đột biến có sự đột biến về amino-acyl t-ARN synthetase (patent Mỹ số 5,658,766). Các ví dụ về các chủng như vậy bao gồm, ví dụ, *E. coli* VL1970 mà có sự đột biến trong gen *ileS* mã hóa isoleucine t-ARN synthetase. *E. coli* VL1970 được lưu giữ ở Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny Proezd, 1 Moscow 117545, Russia) ngày 24 tháng 6 năm 1988 với số truy cập VKPM B-4411. Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-valin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm các chủng đột biến cần axit lipoic cho sự sinh trưởng và/hoặc không có H⁺-ATPase (WO96/06926).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-valin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm các chủng kháng chất đồng đẳng axit amin hoặc chất tương tự. Các ví dụ về các chủng như vậy bao gồm, ví dụ, các chủng vi khuẩn coryneform mà khuyết dưỡng đối với L-isoleucine và L-methionine, và kháng D-ribose, purine ribonucleoside, hoặc pyrimidine ribonucleoside, và có khả năng sản xuất L-valin (FERM P-1841, FERM P-29) (công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 53-025034), các chủng vi khuẩn coryneform kháng polyketide (FERM P-1763, FERM P-1764) (công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 06-065314), và các chủng vi khuẩn coryneform kháng L-valin trong môi trường chứa axit

axetic làm nguồn cacbon duy nhất và mẫn cảm đối với các chất đồng đẳng của axit pyruvic (axit flopyruvic v.v.) trong môi trường chứa glucoza làm nguồn cacbon duy nhất (FERM BP-3006, BP-3007) (patent Nhật Bản số 3006929).

<Vi khuẩn sản xuất L-alanin>

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-alanin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm vi khuẩn coryneform không có H⁺-ATPaza (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001 Nov., 57(4):534-40) và vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính aspartat β -decarboxylaza được gia tăng (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 07-163383).

<Vi khuẩn sản xuất L-tryptophan, vi khuẩn sản xuất L-phenylalanin, và vi khuẩn sản xuất L-tyrosin>

Các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất L-tryptophan, khả năng sản xuất L-phenylalanin, và/hoặc khả năng sản xuất L-tyrosin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều các enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-tryptophan, L-phenylalanin, và/hoặc L-tyrosin.

Các ví dụ về các enzym thông thường đối với các hệ sinh tổng hợp của các axit amin thơm này bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, 3-deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat syntaza (*aroG*), 3-dehydroquinat syntaza (*aroB*), shikimat dehydrogenaza (*aroE*), shikimat kinaza (*aroL*), 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (*aroA*), và chorismat syntaza (*aroC*) (EP763127B). Các mức biểu hiện của các gen mã hóa các enzym này được kiểm soát bởi gen ức chế tyrosin (*tyrR*), và các hoạt tính của các enzym này có thể được gia tăng bằng cách loại bỏ gen *tyrR* (EP763127B).

Các ví dụ về các enzym sinh tổng hợp L-tryptophan bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, antranilat syntaza (*trpE*), tryptophan syntaza (*trpAB*), và phosphoglyxerat dehydrogenaza (*serA*). Ví dụ, bằng cách đưa ADN chứa tryptophan operon vào, khả năng sản xuất L-tryptophan có thể được truyền hoặc gia tăng. Tryptophan syntaza gồm các cấu trúc siêu phân tử α và β được mã hóa bởi các gen *trpA* và *trpB*. Vì antranilat syntaza được ức chế

phản hồi bởi L-tryptophan, gen mã hóa enzym này được đưa vào với sự đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi có thể được sử dụng để gia tăng hoạt tính của enzym đó. Vì phosphoglyxerat dehydrogenaza được ức chế phản hồi bởi L-serin, gen mã hóa enzym này được đưa vào với sự đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi có thể được sử dụng để gia tăng hoạt tính của enzym đó. Hơn nữa, bằng cách gia tăng mức biểu hiện của operon (operon *ace*) chứa gen maleat syntaza (*aceB*), gen isoxitrat lyaza (*aceA*), và gen isoxitrat dehydrogenaza kinaza/phosphataza (*aceK*), khả năng sản xuất L-tryptophan có thể được truyền hoặc được gia tăng (WO2005/103275).

Các ví dụ về các enzym sinh tổng hợp L-phenylalanin bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, chorismat mutaza và prephenat dehydrataza. Chorismat mutaza và prephenat dehydrataza được mã hóa bởi gen *pheA* làm enzym chức năng kép. Vì chorismat mutaza và prephenat dehydrataza được ức chế phản hồi bởi L-phenylalanin, các gen mã hóa các enzym này được đưa vào với sự đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi có thể được sử dụng để gia tăng các hoạt tính các enzym đó.

Các ví dụ về các enzym sinh tổng hợp L-tyrosin bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, chorismat mutaza và prephenat dehydrogenaza. Chorismat mutaza và prephenat dehydrogenaza được mã hóa bởi gen *tyrA* dưới dạng enzym chức năng kép. Vì chorismat mutaza và prephenat dehydrogenaza được ức chế phản hồi bởi L-tyrosin, các gen mã hóa các enzym này được đưa vào với sự đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi có thể được sử dụng để gia tăng các hoạt tính của các enzym đó.

Vi khuẩn sản xuất L-tryptophan, L-phenylalanin, và/hoặc L-tyrosin có thể được cải biến sao cho quá trình sinh tổng hợp axit amin thơm khác với axit amin thơm mong muốn được giảm. Hơn nữa, vi khuẩn sản xuất L-tryptophan, L-phenylalanin, và/hoặc L-tyrosin có thể được cải biến sao cho hệ hấp thu sản phẩm phụ được gia tăng. Các ví dụ về sản phẩm phụ bao gồm các axit amin thơm không phải là axit amin thơm mong muốn. Các ví dụ về gen mã hóa hệ hấp thu sản phẩm phụ bao gồm, ví dụ, *tnaB* và *mtr* là các gen mã hóa hệ hấp thu L-tryptophan, *pheP*, là gen mã hóa hệ hấp thu L-phenylalanin, và *tyrP* là gen mã

hóa hệ hấp thu L-tyrosin (EP1484410).

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-tryptophan và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) và JP6015/pMU91 (DSM10123), mà có gen *trpS* đột biến mã hóa tryptophanyl-tARN synthetaza bị bất hoạt một phần (patent Mỹ số 5,756,345), *E. coli* SV164 mà có alen *trpE* mã hóa antranilat syntaza được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi tryptophan, *E. coli* SV164 (pGH5) mà có alen *serA* mã hóa phosphoglyxerat dehydrogenaza được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi serin và alen *trpE* mã hóa antranilat syntaza được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi tryptophan (patent Mỹ số 6,180,373), chủng được đưa vào với operon tryptophan chứa alen *trpE* mã hóa antranilat syntaza được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi bởi tryptophan (các đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 57-71397 và 62-244382, patent Mỹ số 4,371,614), *E. coli* AGX17(pGX44) (NRRL B-12263) và AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264), mà thiếu hụt tryptophanaza (patent Mỹ số 4,371,614), *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps, mà có sự gia tăng khả năng sản xuất phosphoenolpyruvat (WO97/08333, patent Mỹ số 6,319,696), và các chủng thuộc giống *Escherichia* có sự gia tăng hoạt tính của protein được mã hóa bởi gen *yedA* hoặc gen *yddG* (US2003-0148473A1 và US2003-0157667A1).

Các ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-tryptophan bao gồm, ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* AJ12118 (FERM BP-478, patent Nhật Bản số 1681002) kháng sulfaguanidin, chủng này được đưa vào với operon tryptophan (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 63-240794), và chủng này được đưa vào với gen mã hóa shikimat kinaza thu được từ vi khuẩn coryneform (patent Nhật Bản số 1994749).

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-phenylalanin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng bao gồm, ví dụ, *E. coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197), mà thiếu hụt chorismat mutaza-prephenat dehydrogenaza và gen ức chế tyrosin (WO03/044191), *E. coli* HW1089 (ATCC 55371), mà chứa gen *pheA34* đột biến mã hóa chorismat mutaza-prephenat dehydrataza được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi (patent Mỹ số 5,354,672), *E. coli* MWEC101-b (KR8903681),

E. coli NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146, và NRRL B-12147 (patent Mỹ số 4,407,952). Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-phenylalanin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm, ví dụ, *E. coli* K-12 <W3110(tyrA)/pPHAB> (FERM BP-3566), *E. coli* K-12 <W3110(tyrA)/pPHAD> (FERM BP-12659), *E. coli* K-12 <W3110(tyrA)/pPHATerm> (FERM BP-12662), và *E. coli* K-12 AJ12604 <W3110(tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB> (FERM BP-3579), mà chứa gen mã hóa chorismat mutaza-prephenat dehydrataza được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi (EP488424B1). Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-phenylalanin và các chủng cha mẹ để thu lấy chúng còn bao gồm, ví dụ, các chủng thuộc giống *Escherichia* có sự gia tăng hoạt tính của protein được mã hóa bởi gen *yedA* hoặc gen *yddG* (US2003-0148473A, US2003-0157667A, WO03/044192).

Các ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-phenylalanin bao gồm, ví dụ, các chủng *Corynebacterium glutamicum* BPS-13 (FERM BP-1777), K77 (FERM BP-2062), và K78 (FERM BP-2063) (EP331145A, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 02-303495), trong đó hoạt tính phosphoenolpyruvat carboxylaza hoặc pyruvat kinaza được giảm, và chủng khuyết dưỡng tyrosin (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 05-049489).

Các ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-tyrosin bao gồm, ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* AJ11655 (FERM P-5836, công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản No. 2-6517), và *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12081 (FERM P-7249, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 60-70093).

Hơn nữa, các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản sinh axit L-amin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính để tiết axit L-amin từ tế bào vi khuẩn. Hoạt tính tiết axit L-amin có thể được gia tăng bằng cách, ví dụ, gia tăng mức biểu hiện của gen mã hóa protein chịu trách nhiệm về sự tiết axit L-amin. Các ví dụ về các gen mã hóa các protein chịu trách nhiệm về sự tiết các axit amin khác nhau bao gồm, ví dụ, gen *b2682* (*ygaZ*), gen *b2683* (*ygaH*), gen *b1242* (*yche*), và gen

b3434 (yhgN) (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2002-300874).

Hơn nữa, các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản sinh axit L-amin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho vi khuẩn có sự gia tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều protein được chọn từ các protein liên quan đến quá trình chuyển hóa đường và các protein liên quan đến quá trình chuyển hóa năng lượng.

Các ví dụ về các protein liên quan đến quá trình chuyển hóa đường bao gồm các protein liên quan đến sự hấp thu sacarit và các enzym hệ phân giải glucoza. Các ví dụ về các gen mã hóa protein liên quan đến quá trình chuyển hóa đường bao gồm gen glucoza-6-phosphat isomeraza (*pgi*, WO01/02542), gen pyruvat carboxylaza (*pyc*, WO99/18228, EP1092776A), gen phosphoglucomutaza (*pgm*, WO03/04598), gen fructoza bisphosphat aldolaza (*pfkB*, *fbp*, WO03/04664), gen transaldolaza (*talB*, WO03/008611), gen fumaraza (*fum*, WO01/02545), gen hấp thu sucroza phi-PTS (*csc*, EP1149911A), và gen đồng hóa sucroza (operon *scrAB*, patent Mỹ số 7,179,623).

Các ví dụ về các gen mã hóa các protein liên quan đến quá trình chuyển hóa năng lượng bao gồm gen transhydrogenaza (*pntAB*, patent Mỹ số 5,830,716) và gen oxidaza kiểu xytocrom bo (*cyoB*, EP1070376A).

Hơn nữa, các ví dụ về các phương pháp truyền hoặc gia tăng khả năng sản xuất các chất hữu ích như các axit L-amin bao gồm, ví dụ, phương pháp cải biến vi khuẩn sao cho hoạt tính của phosphoketolaza được gia tăng (WO2006/016705). Vì vậy, vi khuẩn theo sáng chế có thể đã được cải biến sao cho hoạt tính của phosphoketolaza được gia tăng. Phương pháp này có thể truyền hoặc gia tăng khả năng sản sinh axit L-amin thuộc họ glutamat như axit L-glutamic một cách rất hữu hiệu. Các ví dụ về phosphoketolaza bao gồm D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và fructoza-6-phosphat phosphoketolaza. Một hoạt tính trong số hoạt tính D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza có thể được gia tăng, hoặc cả hai hoạt tính có thể đều được gia tăng.

Thuật ngữ “hoạt tính D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza” là để chỉ hoạt tính chuyển hóa xyluloza-5-phosphat thành glyxaldehyt-3-phosphat và axetyl phosphat với sự tiêu thụ axit phosphoric để giải phóng một phân tử H_2O . Hoạt tính này có thể được đo bằng phương pháp được mô tả bởi Goldberg, M. et al. (Methods Enzymol., 9, 515-520, 1996) hoặc phương pháp được mô tả bởi L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001). Các ví dụ về D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza bao gồm các D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza của các vi khuẩn thuộc các giống *Axetobacter*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Thiobacillus*, *Streptococcus*, *Metylococcus*, *Butyrivibrio*, và *Fibrobacter*, và nấm men thuộc các giống *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, và *Wingea*. Các ví dụ cụ thể về D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và các gen mã hóa chúng được đề cập trong WO2006/016705.

Thuật ngữ “hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza” là để chỉ hoạt tính để chuyển hóa fructoza-6-phosphat thành erythroza-4-phosphat và axetyl phosphat với sự tiêu thụ axit phosphoric để giải phóng một phân tử H_2O . Hoạt tính này có thể được đo bằng phương pháp được mô tả bởi Racker, E. (Methods Enzymol., 5, 276-280, 1962) hoặc phương pháp được mô tả bởi L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001). Các ví dụ về fructoza-6-phosphat phosphoketolaza bao gồm fructoza-6-phosphat phosphoketolaza của các vi khuẩn thuộc các giống *Axetobacter*, *Bifidobacterium*, *Chlorobium*, *Brucella*, *Metylococcus*, và *Gardnerella*, và nấm men thuộc các giống *Rhodotorula*, *Candida*, và *Saccharomyces*. Các ví dụ cụ thể về fructoza-6-phosphat phosphoketolaza và các gen mã hóa chúng được đề cập trong WO2006/016705.

Cả hoạt tính D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza cũng có thể được giữ lại bởi enzym đơn lẻ (nghĩa là, D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza/fructoza-6-phosphat phosphoketolaza).

Trình tự nucleotit của gen phosphoketolaza (gen *xfp*) của *Bifidobacterium longum* JCM1217 và trình tự axit amin của phosphoketolaza được mã hóa bởi gen (Xfp protein) được thể hiện trong các SEQ ID NO: 13 và 14.

Các gen và các protein được sử dụng để nhân giống vi khuẩn sản xuất axit L-amin có thể có, ví dụ, các trình tự nucleotit và các trình tự axit amin của các gen và các protein đã biết như được lấy làm ví dụ ở trên. Ngoài ra, các gen và các protein được sử dụng để nhân giống vi khuẩn sản xuất axit L-amin có thể là các thể biến dị bảo toàn của các gen và các protein đã biết, như được lấy làm ví dụ ở trên. Cụ thể, ví dụ, các gen được sử dụng để nhân giống vi khuẩn sản xuất axit L-amin có thể là gen mã hóa protein có trình tự axit amin của protein đã biết, nhưng bao gồm sự thiếu đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, hoặc thêm đoạn của một hoặc vài gốc axit amin ở một hoặc vài vị trí, miễn là chức năng ban đầu của nó được duy trì. Đối với các thể biến dị bảo toàn của các gen và các protein, các phần mô tả liên quan đến các thể biến dị bảo toàn của gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic và vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được đề cập dưới đây có thể được ứng dụng, với các thay đổi cần thiết.

<1-2> Sự gia tăng hoạt tính vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic

Vi khuẩn theo sáng chế đã được cải biến sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng. Vi khuẩn theo sáng chế đã được cải biến cụ thể sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng so với chủng không được cải biến. Vi khuẩn theo sáng chế có thể thu được bằng cách cải biến vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng. Vi khuẩn theo sáng chế cũng có thể thu được bằng cách cải biến vi khuẩn sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng, và sau đó truyền hoặc gia tăng khả năng sản sinh axit L-amin. Vi khuẩn theo sáng chế cũng có thể là vi khuẩn mà đã thu được khả năng sản sinh axit L-amin bằng cách được cải biến sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng. Vi khuẩn theo sáng chế có thể có, nếu cần, đặc tính vốn có của vi khuẩn sản xuất axit L-amin như nêu trên, cũng như được cải biến sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng. Ví dụ, vi khuẩn theo sáng chế có thể đã được cải biến sao cho hoạt tính của phosphoketolaza được gia tăng. Các sự cải biến để hình thành vi khuẩn theo sáng chế có thể được tiến hành theo trình tự bất kỳ.

Bằng cách cải biến vi khuẩn sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit

C4-dicarboxylic được gia tăng, khả năng sản sinh axit L-amin của vi khuẩn có thể được cải thiện, và mức sản xuất axit L-amin bằng cách sử dụng vi khuẩn có thể được gia tăng. Cụ thể, mong muốn rằng, bằng cách cải biến vi khuẩn sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng, khả năng sản sinh axit L-amin của vi khuẩn trong các điều kiện ở đó axit L-aspartic được tạo ra dưới dạng sản phẩm phụ có thể được cải thiện, và nghĩa là, mức sản xuất axit L-amin bằng cách sử dụng vi khuẩn có thể được gia tăng. Các ví dụ về "sự gia tăng mức sản xuất axit L-amin" bao gồm cải thiện (gia tăng) lượng axit L-amin tích tụ trong môi trường. Nghĩa là, nhờ sự gia tăng hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic như DctA protein, cụ thể hơn, nhờ gia tăng mức biểu hiện của gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic như gen *dctA*, chẳng hạn, lượng tích tụ của axit L-amin như axit L-glutamic trong môi trường có thể được cải thiện (được gia tăng). Hơn nữa, cụ thể, người ta mong muốn rằng, bằng cách cải biến vi khuẩn sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng, sự tạo ra sản phẩm phụ axit L-aspartic có thể được giảm.

Sau đây, các vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic và các gen mã hóa chúng sẽ được giải thích.

Thuật ngữ "vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic" là đề cập đến protein có hoạt tính hấp thu axit C4-dicarboxylic. Thuật ngữ "hoạt tính hấp thu axit C4-dicarboxylic" là đề cập đến hoạt tính hấp thu axit C4-dicarboxylic (axit carboxylic có 4 nguyên tử cacbon) từ bên ngoài tế bào đến bên trong tế bào. Các ví dụ về axit C4-dicarboxylic bao gồm axit aspartic. Gen mã hóa vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic còn được gọi là "gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic".

Các ví dụ về gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic bao gồm gen *dctA*, gen *dcuA*, và gen *dcuB*. Các protein được mã hóa bởi gen *dctA*, gen *dcuA*, và gen *dcuB* còn được gọi là "protein DctA", "protein DcuA", và "protein DcuB". Tất cả các protein này có hoạt tính hấp thu axit aspartic. Trong sáng chế, hoạt tính của một loại vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể được gia tăng, hoặc các hoạt tính của hai hoặc nhiều loại vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể được gia tăng. Nghĩa là, vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic mà có hoạt tính

được gia tăng có thể bao gồm một hoặc nhiều loại protein được chọn từ protein DctA, protein DcuA, và protein DcuB. Hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể được gia tăng bằng cách, ví dụ, gia tăng mức biểu hiện của gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic. Tức là, cụm từ "hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng" có thể có nghĩa là, ví dụ, mức biểu hiện của gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng. Cụm từ "hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng" cũng có thể có nghĩa là, ví dụ, mức biểu hiện của một hoặc nhiều loại gen được chọn từ gen *dctA*, gen *dcuA*, và gen *dcuB* được gia tăng.

Các ví dụ về gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic bao gồm các gen của các sinh vật khác nhau như các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* và các vi khuẩn coryneform. Các trình tự nucleotit của các gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic thu được từ các sinh vật khác nhau và các trình tự axit amin của các vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được mã hóa bằng cách đó có thể thu được từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu chung như NCBI. Các ví dụ cụ thể về gen *dctA* bao gồm, ví dụ, gen *dctA* (NCgl2506) của *C. glutamicum* và gen *dctA* của *E. coli*. Các ví dụ cụ thể về gen *dcuA* bao gồm, ví dụ, gen *dcuA* của *E. coli*. Các ví dụ cụ thể về gen *dcuB* bao gồm, ví dụ, gen *dcuB* của *E. coli*. Trình tự nucleotit của gen *dctA* (NCgl2506) của *C. glutamicum* 2256 (ATCC 13869) và trình tự axit amin của protein được mã hóa bởi gen được thể hiện trong các SEQ ID NO: 15 và 16. Trình tự nucleotit của gen *dctA* (NCBI GeneID: 948039) của *E. coli* K-12 MG1655 và trình tự axit amin của protein được mã hóa bởi gen được thể hiện trong các SEQ ID NO: 17 và 18. Trình tự nucleotit của gen *dcuA* (NCBI GeneID: 948659) của *E. coli* K-12 MG1655 và trình tự axit amin của protein được mã hóa bởi gen được thể hiện trong các SEQ ID NO: 19 và 20. Trình tự nucleotit của gen *dcuB* (NCBI GeneID: 948641) của *E. coli* K-12 MG1655 và trình tự axit amin của protein được mã hóa bởi gen được thể hiện trong các SEQ ID NO: 21 và 22. Tức là, gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể là, ví dụ, gen có trình tự nucleotit của gen bất kỳ trong số các gen vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được lấy làm ví dụ ở trên, như trình tự nucleotit được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 15, 17, 19, hoặc 21. Ngoài ra, vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể

là, ví dụ, protein có trình tự axit amin của vật mang bất kỳ trong số các vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được lấy làm ví dụ ở trên, như trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 16, 18, 20, hoặc 22. Cụm từ "gen hoặc protein có trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin" có nghĩa là gen hoặc protein chứa trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin trừ phi được quy định khác, và còn bao gồm các trường hợp ở đó gen hoặc protein gồm trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin.

Gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể là thể biến dị của gen bất kỳ trong số các gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được lấy làm ví dụ ở trên (ví dụ, gen có trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 15, 17, 19, hoặc 21), miễn là chức năng ban đầu của nó được duy trì. Tương tự, vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể là thể biến dị của vật mang bất kỳ trong số các vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được lấy làm ví dụ ở trên (ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 16, 18, 20, hoặc 22), miễn là chức năng ban đầu của nó được duy trì. Thể biến dị mà giữ được chức năng ban đầu của nó còn được gọi là "thể biến dị bảo toàn". Các thuật ngữ "gen *dctA*", "gen *dcuA*", và "gen *dcuB*" bao gồm không chỉ gen *dctA*, gen *dcuA*, và gen *dcuB* được lấy làm ví dụ ở trên, mà còn bao gồm các thể biến dị bảo toàn của chúng. Tương tự, các thuật ngữ "protein DctA", "protein DcuA", và "protein DcuB" bao gồm không chỉ protein DctA, protein DcuA, và protein DcuB được lấy làm ví dụ ở trên, mà còn bao gồm các thể biến dị bảo toàn của chúng. Các ví dụ về các thể biến dị bảo toàn bao gồm, ví dụ, các thể tương đồng và các kiểu cải biến nhân tạo của các gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic và các vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được lấy làm ví dụ ở trên.

Cụm từ "chức năng ban đầu được duy trì" có nghĩa là thể biến dị của gen hoặc protein có chức năng (như hoạt tính hoặc đặc tính) tương ứng với chức năng (như hoạt tính hoặc đặc tính) của gen hoặc protein ban đầu. Cụm từ "chức năng ban đầu được duy trì" được dùng cho gen có nghĩa là thể biến dị của gen mã hóa protein mà giữ được chức năng ban đầu. Tức là, cụm từ "chức năng ban đầu được duy trì" được dùng cho gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có nghĩa là thể biến dị của gen mã hóa protein có hoạt tính hấp thu axit C4-

dicarboxylic, như hoạt tính hấp thu axit aspartic. Hơn nữa, cụm từ "chức năng ban đầu được duy trì" dùng cho vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có nghĩa là thể biến dị của protein có hoạt tính hấp thu axit C4-dicarboxylic, như hoạt tính hấp thu axit aspartic.

Hoạt tính hấp thu axit C4-dicarboxylic của protein có thể được đo bằng cách, ví dụ, ủ các tế bào vi khuẩn biểu hiện protein với axit C4-dicarboxylic, và đo sự hấp thu axit C4-dicarboxylic phụ thuộc protein trong các tế bào.

Sau đây, các ví dụ về các thể biến dị bảo toàn sẽ được giải thích.

Các thể tương đồng của các gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic hoặc các thể tương đồng của các vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể thu được dễ dàng từ cơ sở dữ liệu chung bằng cách, ví dụ, tra cứu BLAST hoặc tra cứu FASTA sử dụng trình tự nucleotit bất kỳ của các gen vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được lấy làm ví dụ ở trên hoặc trình tự axit amin bất kỳ của các vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được lấy làm ví dụ ở trên làm trình tự truy vấn. Hơn nữa, các thể tương đồng của các gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể thu được bằng cách, ví dụ, PCR sử dụng nhiễm sắc thể của các sinh vật khác nhau làm khuôn mẫu, và các oligonucleotit được tạo ra trên cơ sở trình tự nucleotit bất kỳ của các gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic đã biết này làm các đoạn mồi.

Gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể là gen mã hóa protein có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin nêu trên (ví dụ, trình tự axit amin như được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 16, 18, 20, hoặc 22), nhưng còn gồm cả sự thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, và/hoặc thêm đoạn của một hoặc vài gốc axit amin ở một hoặc vài vị trí, miễn là chức năng ban đầu được duy trì. Ví dụ, đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C của protein được mã hóa có thể được kéo dài hoặc rút ngắn lại. Mặc dù số lượng ở đây được xác định bởi thuật ngữ "một hoặc vài" nêu trên có thể khác nhau tùy thuộc vào các vị trí của gốc axit amin trong cấu trúc ba chiều của protein hoặc các kiểu gốc axit amin, cụ thể, số lượng này là, ví dụ, 1 đến 50, 1 đến 40, hoặc 1 đến 30, tốt hơn là 1 đến 20, tốt hơn nữa là 1 đến 10, vẫn tốt hơn nữa là 1 đến 5, tốt nhất là 1 đến 3 gốc.

Sự thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn và/hoặc thêm đoạn nêu trên của một

hoặc vài gốc axit amin là sự đột biến bảo toàn mà giữ được chức năng bình thường của protein. Các ví dụ cụ thể về đột biến bảo toàn là các sự thế đoạn bảo toàn. Sự thế đoạn bảo toàn là sự đột biến trong đó sự thay thế diễn ra qua lại giữa Phe, Trp, và Tyr, nếu vị trí thay thế là axit amin thơm; giữa Leu, Ile, và Val, nếu nó là axit amin kỵ nước; giữa Gln và Asn, nếu nó là axit amin phân cực; giữa Lys, Arg, và His, nếu nó là axit amin kiềm; giữa Asp và Glu, nếu nó là axit amin axit; và giữa Ser và Thr, nếu nó là axit amin có nhóm hydroxyl. Các ví dụ về các sự thế đoạn được cho là các sự thế đoạn bảo toàn bao gồm, cụ thể, sự thay thế của Ser hoặc Thr cho Ala, sự thay thế của Gln, His, hoặc Lys cho Arg, sự thay thế của Glu, Gln, Lys, His, hoặc Asp cho Asn, sự thay thế của Asn, Glu, hoặc Gln cho Asp, sự thay thế của Ser hoặc Ala cho Cys, sự thay thế của Asn, Glu, Lys, His, Asp, hoặc Arg cho Gln, sự thay thế của Gly, Asn, Gln, Lys, hoặc Asp cho Glu, sự thay thế của Pro cho Gly, sự thay thế của Asn, Lys, Gln, Arg, hoặc Tyr cho His, sự thay thế của Leu, Met, Val, hoặc Phe cho Ile, sự thay thế của Ile, Met, Val, hoặc Phe cho Leu, sự thay thế của Asn, Glu, Gln, His, hoặc Arg cho Lys, sự thay thế của Ile, Leu, Val, hoặc Phe cho Met, sự thay thế của Trp, Tyr, Met, Ile, hoặc Leu cho Phe, sự thay thế của Thr hoặc Ala cho Ser, sự thay thế của Ser hoặc Ala cho Thr, sự thay thế của Phe hoặc Tyr cho Trp, sự thay thế của His, Phe, hoặc Trp cho Tyr, và sự thay thế của Met, Ile, hoặc Leu cho Val. Hơn nữa, sự thế đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, hoặc thêm đoạn như vậy của gốc axit amin như nêu trên bao gồm sự đột biến xuất hiện tự nhiên do sự khác nhau của cá thể, hoặc sự khác nhau của các loài sinh vật mà từ đó gen được thu lấy (thể đột biến hoặc thể biến dị).

Gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể là gen mã hóa protein có trình tự axit amin thể hiện độ tương đồng, ví dụ, bằng hoặc lớn hơn 50%, bằng hoặc lớn hơn 65%, hoặc bằng hoặc lớn hơn 80%, tốt hơn là bằng hoặc lớn hơn 90%, tốt hơn nữa là bằng hoặc lớn hơn 95%, vẫn tốt hơn nữa là bằng hoặc lớn hơn 97%, tốt nhất là bằng hoặc lớn hơn 99%, so với toàn bộ trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin nêu trên, miễn là chức năng ban đầu được duy trì. Trong bản mô tả này, "độ tương đồng" có nghĩa là "tính đồng nhất".

Gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic cũng có thể là ADN mà có khả năng lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt với đoạn dò mà có thể được tạo ra từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit nêu trên (ví dụ, trình tự nucleotit được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 15, 17, 19, hoặc 21), như trình tự bổ trợ cho một phần hoặc toàn bộ trình tự của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit nêu trên, miễn là chức năng ban đầu được duy trì. Thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt" là để chỉ các điều kiện mà cái gọi là thể lai đặc trưng được tạo ra, và thể lai không đặc trưng không được tạo ra. Các ví dụ về các điều kiện nghiêm ngặt bao gồm các điều kiện trong đó các ADN tương đồng cao lai với nhau, ví dụ, các ADN có độ tương đồng không nhỏ hơn 50%, 65%, hoặc 80%, tốt hơn là có độ tương đồng không nhỏ hơn 90%, tốt hơn nữa là có độ tương đồng không nhỏ hơn 95%, vẫn tốt hơn nữa là có độ tương đồng không nhỏ hơn 97%, tốt nhất là có độ tương đồng không nhỏ hơn 99%, lai với nhau, và các ADN có độ tương đồng nhỏ hơn các mức nêu trên không lai với nhau, hoặc các điều kiện rửa của quá trình lai Southern, tức là, các điều kiện rửa một lần, tốt hơn là 2 hoặc 3 lần, ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 1 x SSC, 0,1% SDS ở 60°C, tốt hơn là 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở 60°C, tốt hơn nữa là 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở 68°C.

Đoạn dò được dùng cho quá trình lai nêu trên có thể là một phần của trình tự mà bổ trợ cho gen như được mô tả ở trên. Đoạn dò như vậy có thể được tạo ra bằng quá trình PCR sử dụng các oligonucleotit được tạo ra trên cơ sở trình tự gen đã biết làm đoạn mồi và đoạn ADN chứa gen bất kỳ trong số các gen nêu trên làm khuôn mẫu. Để làm đoạn dò, ví dụ, đoạn ADN có độ dài khoảng 300bp có thể được sử dụng. Khi đoạn ADN có độ dài khoảng 300 bp được sử dụng làm đoạn dò, các điều kiện rửa của quá trình lai có thể là, ví dụ, 50°C, 2 x SSC và 0,1% SDS.

Hơn nữa, vì sự thoái hóa của các codon khác nhau tùy thuộc vào vật chủ, các codon bất kỳ trong gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể được thay thế bằng các codon tương đương tương ứng. Nghĩa là, gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể là thể biến dị của bất kỳ các gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được lấy làm ví dụ ở trên do sự thoái hóa của mã di truyền. Ví dụ,

gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có thể là gen được cải biến sao cho nó có các codon tối ưu theo tần suất codon trong vật chủ được sử dụng.

Tỷ lệ phần trăm độ đồng nhất trình tự giữa hai trình tự có thể được xác định bằng, ví dụ, sử dụng thuật toán toán học. Các ví dụ không giới hạn về thuật toán toán học như vậy bao gồm thuật toán của Myers và Miller (1988) CABIOS 4:11-17, thuật toán tương đồng cục bộ của Smith et al (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, thuật toán so sánh tương đồng của Needleman và Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453, phương pháp tra cứu độ tương đồng của Pearson và Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448, và kiểu biến đổi của thuật toán của Karlin và Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, như thuật toán được đề cập trong Karlin và Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

Bằng cách sử dụng chương trình dựa trên thuật toán toán học, sự so sánh trình tự (nghĩa là sự căn thẳng hàng) để xác định tính đồng nhất trình tự có thể được thực hiện. Chương trình này có thể được thực hiện bằng máy tính. Các ví dụ về chương trình như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chương trình CLUSTAL of PC/Gene (bán tại Intelligenetics, Mountain View, Calif.), chương trình ALIGN (Version 2.0), và GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, and TFASTA of Wisconsin Genetics Software Package, Version 8 (bán tại Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wis., USA). Sự căn thẳng hàng sử dụng các chương trình này có thể được tiến hành bằng cách sử dụng, ví dụ, các tham số ban đầu. Chương trình CLUSTAL cũng được đề cập trong Higgins et al. (1988) gen 73:237-244 (1988), Higgins et al. (1989) CABIOS 5:151-153, Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90, Huang et al. (1992) CABIOS 8:155-65, và Pearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331.

Để thu được trình tự nucleotit tương đồng với trình tự nucleotit đích, cụ thể, ví dụ, sự tra cứu nucleotit BLAST có thể được tiến hành bằng cách sử dụng chương trình BLASTN với thang điểm 100 và độ dài chuỗi ký tự là 12. Để thu được trình tự axit amin tương đồng với protein đích, cụ thể là, ví dụ, quá trình tra cứu protein BLAST có thể được tiến hành bằng cách sử dụng chương trình BLASTX với thang điểm 50 và độ dài chuỗi ký tự 3. Xem

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> để tra cứu nucleotit BLAST và tra cứu protein BLAST. Ngoài ra, Gapped BLAST (BLAST 2.0) có thể được sử dụng để thu được sự căn thẳng hàng bao gồm cả (các) khoảng trống với mục đích so sánh. Ngoài ra, PSI-BLAST có thể được sử dụng để thực hiện sự tra cứu lặp để phát hiện các mối tương quan khoảng cách giữa các trình tự. Xem Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389 for Gapped BLAST and PSI-BLAST. Khi sử dụng BLAST, Gapped BLAST, hoặc PSI-BLAST, các tham số ban đầu của từng chương trình (ví dụ, BLASTN cho các trình tự nucleotit, và BLASTX cho các trình tự axit amin) có thể được sử dụng. Sự căn thẳng hàng cũng có thể được thực hiện một cách thủ công.

Độ đồng nhất trình tự giữa hai trình tự được tính dưới dạng tỷ lệ so khớp các gốc ở hai trình tự khi căn thẳng hàng hai trình tự để khớp đến mức tối đa với nhau.

Các phần mô tả nêu trên liên quan đến các thể biến dị bảo toàn của các gen và các protein có thể được áp dụng với các sự thay đổi cần thiết cho các thể biến dị của các protein bất kỳ như các enzym của hệ sinh tổng hợp axit L-amin và các gen mã hóa chúng.

<1-3> Các phương pháp gia tăng hoạt tính protein

Sau đây, các phương pháp gia tăng hoạt tính của protein như vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic sẽ được giải thích.

Cụm từ "hoạt tính của protein được gia tăng" có nghĩa là hoạt tính của protein được gia tăng so với chủng không được cải biến. Cụ thể, cụm từ "hoạt tính của protein được gia tăng" có nghĩa là hoạt tính của protein trên tế bào được gia tăng so với hoạt tính của chủng không được cải biến. Thuật ngữ "chủng không được cải biến" được sử dụng ở đây để chỉ chủng đối chứng mà không được cải biến sao cho hoạt tính của protein mong muốn được gia tăng. Các ví dụ về chủng không được cải biến bao gồm chủng kiểu dại và chủng cha mẹ. Các ví dụ cụ thể về chủng không được cải biến bao gồm các chủng kiểu tương ứng của loài vi khuẩn. Các ví dụ cụ thể về chủng không được cải biến còn bao gồm các chủng được lấy làm ví dụ ở trên liên quan đến sự mô tả vi khuẩn. Nghĩa là, theo một phương án, hoạt tính của protein có thể được gia tăng so với chủng chuẩn,

nghĩa là, chủng chuẩn của loài mà vi khuẩn theo sáng chế nằm trong đó. Theo phương án khác, hoạt tính của protein cũng có thể được gia tăng so với chủng *C. glutamicum* ATCC 13032. Theo phương án khác, hoạt tính của protein cũng có thể được gia tăng so với chủng *C. glutamicum* 2256 (ATCC 13869). Theo phương án khác, hoạt tính của protein cũng có thể được gia tăng so với chủng *E. coli* K-12 MG1655. Theo phương án khác nữa, hoạt tính của protein cũng có thể được gia tăng so với chủng *P. ananatis* AJ13355. Tình trạng mà "hoạt tính của protein được gia tăng" cũng có thể được thể hiện là "hoạt tính của protein được tăng cường". Cụ thể hơn, cụm từ "hoạt tính của protein được gia tăng" có thể có nghĩa là số lượng phân tử protein cho mỗi tế bào được gia tăng, và/hoặc chức năng của từng phân tử protein được gia tăng so với chủng không được cải biến. Nghĩa là, thuật ngữ "hoạt tính" trong cụm từ "hoạt tính của protein được gia tăng" không bị giới hạn ở hoạt tính xúc tác của protein, nhưng cũng có thể có nghĩa là mức phiên mã của gen (tức là lượng ARN thông tin) mã hóa protein, hoặc mức dịch mã của protein (tức là lượng protein). Hơn nữa, tình trạng mà "hoạt tính của protein được gia tăng" bao gồm không chỉ tình trạng mà hoạt tính của protein mong muốn được gia tăng trong chủng sẵn có hoạt tính của protein mong muốn, mà còn là tình trạng mà hoạt tính của protein mong muốn được truyền cho chủng vốn không có hoạt tính của protein mong muốn. Hơn nữa, miễn là hoạt tính của protein được gia tăng, hoạt tính của protein mong muốn vốn đã có trong vật chủ có thể được giảm và/hoặc được loại trừ, và sau đó kiểu thích hợp của protein mong muốn có thể được truyền cho vật chủ.

Mức gia tăng hoạt tính của protein không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là hoạt tính của protein được gia tăng so với chủng không được cải biến. Hoạt tính của protein có thể được gia tăng đến, ví dụ, bằng hoặc hơn 1,5 lần, bằng hoặc hơn 2 lần, hoặc bằng hoặc hơn 3 lần hoạt tính của protein của chủng không được cải biến. Hơn nữa, khi chủng không được cải biến không có hoạt tính của protein mong muốn, có khả năng là protein được tạo ra nhờ sự đưa gen mã hóa protein vào, và ví dụ, protein có thể được tạo ra đến mức mà có thể đo được hoạt tính của nó.

Sự cải biến để gia tăng hoạt tính của protein có thể đạt được bằng cách, ví

dụ, gia tăng mức biểu hiện của gen mã hóa protein. Cụm từ "mức biểu hiện của gen được gia tăng" có nghĩa là mức biểu hiện của gen được gia tăng so với chủng không được cải biến như chủng kiểu dại và chủng cha mẹ. Cụ thể, cụm từ "mức biểu hiện của gen được gia tăng" có nghĩa là mức biểu hiện của gen trong mỗi tế bào được gia tăng so với mức biểu hiện của gen của chủng không được cải biến. Cụ thể hơn, cụm từ "mức biểu hiện của gen được gia tăng" có thể có nghĩa là mức phiên mã của gen (tức là lượng ARN thông tin) được gia tăng, và/hoặc mức dịch mã của gen (tức là lượng protein được biểu hiện từ gen) được gia tăng. Tình trạng "mức biểu hiện của gen được gia tăng" cũng có thể được gọi là "mức biểu hiện của gen được tăng cường". Mức biểu hiện của gen có thể được gia tăng đến, ví dụ, bằng hoặc hơn 1,5 lần, bằng hoặc hơn 2 lần, hoặc bằng hoặc hơn 3 lần mức biểu hiện của gen của chủng không được cải biến. Hơn nữa, tình trạng mà "mức biểu hiện của gen được gia tăng" bao gồm không chỉ tình trạng mà mức biểu hiện của gen mong muốn được gia tăng trong chủng mà vốn đã biểu hiện gen mong muốn, mà còn cả tình trạng mà gen được đưa vào trong chủng không có sự biểu hiện gen mong muốn từ ban đầu, và được biểu hiện trong đó. Nghĩa là, cụm từ "mức biểu hiện của gen được gia tăng" cũng có nghĩa là, ví dụ, gen mong muốn được đưa vào trong chủng mà không có gen đó, và được biểu hiện trong đó.

Mức biểu hiện của gen có thể được gia tăng bằng cách, ví dụ, gia tăng số lượng bản sao của gen.

Số lượng bản sao của gen có thể được gia tăng bằng cách đưa gen vào trong nhiễm sắc thể của vật chủ. Gen có thể được đưa vào trong nhiễm sắc thể bằng cách, ví dụ, sử dụng quá trình tái tổ hợp tương đồng (Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics*, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory). Các ví dụ về phương pháp chuyển gen sử dụng quá trình tái tổ hợp tương đồng bao gồm, ví dụ, phương pháp sử dụng ADN mạch thẳng như sự đính gán được dẫn truyền bởi Red (Datsenko, K.A., và Wanner, B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:6640-6645 (2000)), phương pháp sử dụng plasmit chứa điểm khởi đầu sao chép miễn cảm nhiệt độ, phương pháp sử dụng plasmit có khả năng vận chuyển tiếp hợp, phương pháp sử dụng vật truyền tự sát không có điểm khởi đầu sao

chép mà có chức năng trong vật chủ, và phương pháp tải nạp sử dụng thể thực khuẩn. Chỉ một bản sao, hoặc hai hoặc nhiều bản sao của gen có thể được đưa vào. Ví dụ, bằng cách tiến hành quá trình tái tổ hợp tương đồng sử dụng trình tự mà hiện diện trong nhiều bản sao trên nhiễm sắc thể là đích, nhiều bản sao của gen có thể được đưa vào trong nhiễm sắc thể. Các ví dụ về trình tự mà hiện diện trong nhiều bản sao trên nhiễm sắc thể bao gồm các ADN lặp, và các đoạn lặp đảo nằm ở cả hai đầu của gen nhảy. Theo cách khác, quá trình tái tổ hợp tương đồng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng trình tự thích hợp trên nhiễm sắc thể như gen không cần thiết cho quá trình tạo ra chất mong muốn làm đích. Hơn nữa, gen cũng có thể được đưa ngẫu nhiên vào trong nhiễm sắc thể bằng cách sử dụng gen nhảy hoặc Mini-Mu (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2-109985, patent Mỹ số 5,882,888, EP805867B1).

Sự đưa gen đích vào trong nhiễm sắc thể có thể được xác nhận bằng phép lai Southern sử dụng đoạn dò có trình tự bổ trợ cho toàn bộ gen hoặc một phần của gen, quá trình PCR sử dụng các đoạn mồi được tạo ra trên cơ sở trình tự của gen, hoặc tương tự.

Hơn nữa, số lượng bản sao của gen cũng có thể được gia tăng bằng cách đưa vật truyền chứa gen vào trong vật chủ. Ví dụ, số lượng bản sao của gen đích có thể được gia tăng bằng cách gắn đoạn ADN chứa gen đích với vật truyền mà có chức năng trong vật chủ để tạo ra vật truyền biểu hiện của gen, và biến nạp vật chủ với vật truyền biểu hiện. Đoạn ADN chứa gen đích có thể thu được bằng cách, ví dụ, PCR sử dụng ADN hệ gen của vi sinh vật có gen đích làm khuôn mẫu. Để làm vật truyền, vật truyền có khả năng sao chép tự trị trong tế bào của vật chủ có thể được sử dụng. Tốt hơn là, vật truyền là vật truyền nhiều bản sao. Hơn nữa, tốt hơn là vật truyền có gen đánh dấu như gen kháng kháng sinh để chọn lọc thể biến nạp. Hơn nữa, vật truyền có thể có đoạn khởi đầu và/hoặc điểm kết thúc để biểu hiện gen được đưa vào. Vật truyền có thể là, ví dụ, vật truyền thu được từ plasmit vi khuẩn, vật truyền thu được từ plasmit nấm men, vật truyền thu được từ thể thực khuẩn, cosmit, phagemit, hoặc tương tự. Các ví dụ cụ thể về vật truyền có khả năng sao chép tự trị trong các vi khuẩn *Enterobacteriaceae* như *Escherichia coli* bao gồm, ví dụ, pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399,

pHSG398, pBR322, pSTV29 (đều bán tại Takara Bio), pACYC184, pMW219 (NIPPON GENE), pTrc99A (Pharmacia), chuỗi vật truyền pPROK (Clontech), pKK233-2 (Clontech), chuỗi vật truyền pET (Novagen), chuỗi vật truyền pQE (QIAGEN), pCold TF DNA (Takara Bio), chuỗi vật truyền pACYC, và vật truyền có phổ vật chủ rộng RSF1010. Các ví dụ cụ thể về vật truyền có khả năng sao chép tự trị trong vi khuẩn coryneform bao gồm, ví dụ, pHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)); pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)); các plasmit thu được bằng cách cải thiện các vật truyền này và có gen kháng thuốc; plasmit pCRY30 (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 3-210184); các plasmit pCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pCRY31, pCRY3KE, và pCRY3KX (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2-72876 và patent Mỹ số 5,185,262); các plasmit pCRY2 và pCRY3 (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 1-191686); pAJ655, pAJ611, và pAJ1844 (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 58-192900); pCG1 (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 57-134500); pCG2 (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 58-35197); pCG4 và pCG11 (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 57-183799); pVK7 (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 10-215883); pVK9 (US2006-0141588); pVC7 (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 9-070291); pVS7 (WO2013/069634).

Khi gen được đưa vào, có khả năng là gen này được mang theo cách được biểu hiện bởi vật chủ. Cụ thể, có khả năng là gen được mang bởi vật chủ đến mức nó được biểu hiện dưới sự điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu mà có chức năng trong vật chủ. Đoạn khởi đầu không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó có chức năng trong vật chủ. Thuật ngữ “đoạn khởi đầu mà có chức năng trong vật chủ” để chỉ đoạn khởi đầu mà thể hiện hoạt tính đoạn khởi đầu trong vật chủ. Đoạn khởi đầu có thể là đoạn khởi đầu thu được từ vật chủ, hoặc đoạn khởi đầu dị nguyên. Đoạn khởi đầu này có thể là đoạn khởi đầu nguyên thể của gen được đưa vào, hoặc đoạn khởi đầu của gen khác. Để làm đoạn khởi đầu, ví dụ, đoạn khởi đầu mạnh hơn như được đề cập dưới đây cũng có thể được sử dụng.

Điểm kết thúc để kết thúc sự phiên mã gen có thể được định vị ở dòng dưới của gen. Điểm kết thúc không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó có chức năng trong vật chủ. Điểm kết thúc có thể là điểm kết thúc thu được từ vật chủ, hoặc điểm kết thúc dị nguyên. Điểm kết thúc có thể là điểm kết thúc nguyên thể của gen được đưa vào, hoặc điểm kết thúc của gen khác. Các ví dụ cụ thể về điểm kết thúc bao gồm, ví dụ, điểm kết thúc T7, điểm kết thúc T4, điểm kết thúc của thể thực khuẩn fd, điểm kết thúc *tet*, và điểm kết thúc *trpA*.

Các vật truyền, các đoạn khởi đầu, và các điểm kết thúc có giá trị trong các vi sinh vật khác nhau được đề cập chi tiết trong "Fundamental Microbiology Vol. 8, Genetic Engineering, KYORITSU SHUPPAN CO., LTD, 1987", và chúng có thể được sử dụng.

Hơn nữa, khi hai hoặc nhiều gen được đưa vào, có khả năng là mỗi gen trong số các gen này được mang theo cách biểu hiện được bởi vật chủ. Ví dụ, tất cả các gen này có thể được mang bởi nhiễm sắc thể hoặc vật truyền biểu hiện riêng rẽ. Hơn nữa, các gen này có thể được mang riêng biệt bởi hai hoặc nhiều vật truyền biểu hiện, hoặc được mang riêng biệt bởi vật truyền biểu hiện riêng biệt hoặc hai hoặc nhiều vật truyền biểu hiện và nhiễm sắc thể. Operon được tạo thành bởi hai hoặc nhiều các gen cũng có thể được đưa vào. Trường hợp "đưa hai hoặc nhiều gen vào" bao gồm, ví dụ, các trường hợp đưa các gen tương ứng mã hóa hai hoặc nhiều loại protein (như các enzym) vào, đưa các gen tương ứng mã hóa hai hoặc nhiều cấu trúc siêu phân tử tạo thành phức hợp protein đơn (như phức hợp enzym), và sự kết hợp của các trường hợp nêu trên.

Gen được đưa vào không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó mã hóa protein mà có chức năng trong vật chủ. Gen được đưa vào có thể là gen thu được từ vật chủ, hoặc có thể là gen dị nguyên. Gen được đưa vào có thể thu được bằng, ví dụ, quá trình PCR sử dụng các đoạn mồi được tạo ra trên cơ sở trình tự nucleotit của gen, và sử dụng ADN hệ gen của sinh vật có gen, plasmit mang gen, hoặc tương tự làm khuôn mẫu. Gen được đưa vào cũng có thể được tổng hợp hoàn toàn, ví dụ, trên cơ sở trình tự nucleotit của gen (Gene, 60(1), 115-127 (1987)). Gen thu được có thể được sử dụng luôn, hoặc sau khi được cải biến nếu cần. Gen có thể được cải biến bằng kỹ thuật đã biết. Ví dụ, sự đột biến mong

muốn có thể được đưa vào trong vị trí mong muốn của ADN bằng phương pháp đột biến điểm đặc hiệu. Tức là, vùng mã hóa của gen có thể được cải biến bằng phương pháp đột biến điểm đặc hiệu sao cho vị trí đặc hiệu của protein được mã hóa bao gồm sự thay thế, loại bỏ, xen, và/hoặc thêm gốc axit amin. Các ví dụ về phương pháp đột biến điểm đặc hiệu bao gồm phương pháp sử dụng PCR (Higuchi, R., 61, in PCR Technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton Press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)), và phương pháp sử dụng thể thực khuẩn (Kramer, W. và Frits, H.J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T.A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)).

Hơn nữa, khi protein có chức năng như phức hợp gồm nhiều cấu trúc siêu phân tử, một phần hoặc tất cả các cấu trúc siêu phân tử này có thể được cải biến, miễn là hoạt tính của protein được gia tăng. Nghĩa là, ví dụ, khi hoạt tính của protein được gia tăng bằng cách gia tăng mức biểu hiện của gen, mức biểu hiện của một phần hoặc tất cả các gen mà mã hóa các cấu trúc siêu phân tử có thể được gia tăng. Thông thường tốt hơn là tăng cường mức biểu hiện của tất cả các gen mã hóa các cấu trúc siêu phân tử. Hơn nữa, các cấu trúc siêu phân tử cấu thành phức hợp này có thể thu được từ một loại sinh vật đơn lẻ hoặc hai hoặc nhiều loại sinh vật, miễn là phức hợp này có chức năng của protein mong muốn. Nghĩa là, ví dụ, các gen của cùng một sinh vật mã hóa nhiều cấu trúc siêu phân tử có thể được đưa vào trong vật chủ, hoặc các gen của các sinh vật khác nhau mã hóa nhiều cấu trúc siêu phân tử có thể được đưa vào trong vật chủ.

Hơn nữa, mức biểu hiện của gen có thể được gia tăng bằng cách gia tăng hiệu suất phiên mã của gen. Ngoài ra, mức biểu hiện của gen cũng có thể được gia tăng bằng cách gia tăng hiệu suất dịch mã của gen. Hiệu suất phiên mã của gen và hiệu suất dịch mã của gen có thể được cải thiện bằng cách, ví dụ, cải biến trình tự điều chỉnh mức biểu hiện của gen. Thuật ngữ “trình tự điều chỉnh mức biểu hiện” là đề cập đến các vị trí mà ảnh hưởng đến mức biểu hiện của gen. Các ví dụ về trình tự điều chỉnh mức biểu hiện bao gồm, ví dụ, đoạn khởi đầu, chuỗi Shine-Dalgarno (SD) (còn được gọi là vị trí liên kết ribosom (RBS-ribosome binding site)), và vùng đệm giữa RBS và codon khởi đầu. Các trình tự điều chỉnh mức biểu hiện có thể được nhận biết bằng cách sử dụng phần mềm phân tích vật

truyền hoặc gen tìm kiếm đoạn khởi đầu như GENETYX. Các trình tự điều chỉnh mức biểu hiện này có thể được cải biến bằng, ví dụ, phương pháp sử dụng vật truyền mẫn cảm nhiệt độ, hoặc phương pháp dính gắn được dẫn truyền bởi Red (WO2005/010175).

Hiệu suất phiên mã của gen có thể được cải thiện bằng cách, ví dụ, thay thế đoạn khởi đầu của gen trên nhiễm sắc thể bằng đoạn khởi đầu mạnh hơn. Thuật ngữ “đoạn khởi đầu mạnh hơn” để chỉ đoạn khởi đầu đưa ra mức phiên mã của gen cao hơn so với đoạn khởi đầu kiểu đại vốn có của gen. Các ví dụ về các đoạn khởi đầu mạnh hơn bao gồm, ví dụ, các đoạn khởi đầu có mức biểu hiện cao đã biết như đoạn khởi đầu T7, đoạn khởi đầu *trp*, đoạn khởi đầu *lac*, đoạn khởi đầu *thr*, đoạn khởi đầu *tac*, đoạn khởi đầu *trc*, đoạn khởi đầu *tet*, đoạn khởi đầu *araBAD*, đoạn khởi đầu *rpoH*, đoạn khởi đầu *msrA*, đoạn khởi đầu Pm1 (thu được từ giống *Bifidobacterium*), đoạn khởi đầu PR, và đoạn khởi đầu PL. Các ví dụ về các đoạn khởi đầu mạnh hơn có thể sử dụng được trong vi khuẩn coryneform bao gồm, ví dụ, đoạn khởi đầu P54-6 được cải biến nhân tạo (Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679 (2000)), các đoạn khởi đầu *pta*, *aceA*, *aceB*, *adh*, và *amyE* có thể cảm ứng trong vi khuẩn coryneform với axit axetic, etanol, axit pyruvic, hoặc tương tự, các đoạn khởi đầu *cspB*, *SOD*, và *tuf* (EF-Tu), là các đoạn khởi đầu tiềm năng có khả năng tạo ra mức biểu hiện lớn trong vi khuẩn coryneform (Journal of Biotechnology, 104 (2003) 311-323; Appl. Environ. Microbiol., 2005 Dec; 71 (12):8587-96), cũng như đoạn khởi đầu *lac*, đoạn khởi đầu *tac*, và đoạn khởi đầu *trc*. Hơn nữa, để làm đoạn khởi đầu mạnh hơn, kiểu hoạt tính cao của đoạn khởi đầu hiện có cũng có thể thu được bằng cách sử dụng các gen báo cáo khác nhau. Ví dụ, bằng cách tạo ra các vùng -35 và -10 ở đoạn khởi đầu gần với trình tự liên ứng, hoạt tính của đoạn khởi đầu có thể được gia tăng (WO00/18935). Các ví dụ về đoạn khởi đầu kiểu hoạt tính cao bao gồm các đoạn khởi đầu tương tự tac khác nhau (Katashkina II et al., đơn yêu cầu cấp patent Nga số 2006134574) và đoạn khởi đầu *pnlp8* (WO2010/027045). Các phương pháp đánh giá cường độ của các đoạn khởi đầu và các ví dụ về các đoạn khởi đầu mạnh được đề cập trong tài liệu của Goldstein et al. (Prokaryotic Promoters in Biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995)), và v.v..

Hiệu suất dịch mã của gen có thể được cải thiện bằng cách, ví dụ, thay thế chuỗi Shine-Dalgarno (SD) (còn được gọi là vị trí liên kết ribosom (RBS)) cho gen trên nhiễm sắc thể bằng chuỗi SD mạnh hơn. "Chuỗi SD mạnh hơn" có nghĩa là chuỗi SD mà tạo ra sự dịch mã của ARN thông tin cao hơn so với trình tự SD kiểu đại có sẵn của gen. Các ví dụ về các chuỗi SD mạnh hơn bao gồm, ví dụ, RBS của gen *10* thu được từ thể thực khuẩn T7 (Olins P.O. et al, Gene, 1988, 73, 227-235). Hơn nữa, đã biết rằng sự thể đoạn, xen đoạn, hoặc khuyết đoạn của vài nucleotit trong vùng đệm giữa RBS và codon khởi đầu, đặc biệt là ở trình tự ngay dòng trên của codon khởi đầu (5'-UTR), ảnh hưởng lớn đến tính ổn định và hiệu suất dịch mã của ARN thông tin, và vì vậy, hiệu suất dịch mã của gen cũng có thể được cải thiện bằng cách cải biến chúng.

Hiệu suất dịch mã của gen cũng có thể được cải thiện bằng cách, ví dụ, cải biến các codon. Ví dụ, hiệu suất dịch mã của gen có thể được cải thiện bằng cách thay thế codon hiếm khi hiện diện trong gen bằng codon cùng nghĩa được sử dụng thường xuyên hơn. Tức là, gen được đưa vào có thể được cải biến, ví dụ, để chứa các codon tối ưu theo tần suất của các codon quan sát được trong vật chủ được sử dụng. Các codon có thể được thay thế bằng, ví dụ, phương pháp đột biến điểm đặc hiệu. Theo cách khác, đoạn gen trong đó các codon mong muốn được thay thế có thể được tổng hợp toàn bộ. Tần suất của các codon trong các sinh vật khác nhau được đề cập trong "Codon Usage Database" (<http://www.kazusa.or.jp/codon>; Nakamura, Y. et al, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)).

Hơn nữa, mức biểu hiện của gen cũng có thể được gia tăng bằng cách khuếch đại yếu tố điều hòa mà gia tăng mức biểu hiện của gen, hoặc loại bỏ hoặc làm suy giảm yếu tố điều hòa mà làm giảm mức biểu hiện của gen.

Các phương pháp gia tăng mức biểu hiện của gen như nêu trên có thể được sử dụng một cách độc lập hoặc theo sự kết hợp bất kỳ.

Hơn nữa, sự cải biến mà gia tăng hoạt tính của protein cũng có thể đạt được bằng cách, ví dụ, tăng cường hoạt tính đặc trưng của enzym. Sự tăng cường hoạt tính đặc trưng cũng bao gồm sự khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi. Nghĩa là, khi protein được đem đi ức chế phản hồi bởi chất chuyển hóa, hoạt tính của

protein có thể được gia tăng bằng cách làm cho vi khuẩn mang gen mã hóa protein đột biến mà đã được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi. Theo sáng chế, thuật ngữ “khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi” bao gồm loại trừ hoàn toàn sự ức chế phản hồi, và giảm sự ức chế phản hồi, trừ phi được quy định khác. Ngoài ra, tình trạng “được khử nhạy đối với sự ức chế phản hồi”, nghĩa là tình trạng mà sự ức chế phản hồi được loại trừ hoặc được giảm, cũng có thể được gọi là “chịu được sự ức chế phản hồi”. Protein thể hiện hoạt tính đặc trưng được tăng cường có thể thu được bằng cách, ví dụ, tìm kiếm các sinh vật khác nhau. Hơn nữa, kiểu hoạt tính cao của protein hiện có cũng có thể thu được bằng cách đưa sự đột biến vào trong protein này. Sự đột biến được đưa vào có thể là, ví dụ, sự thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, hoặc thêm đoạn của một hoặc vài gốc axit amin ở một hoặc vài vị trí của protein. Sự đột biến có thể được đưa vào bằng cách, ví dụ, phương pháp đột biến điểm đặc hiệu như nêu trên. Sự đột biến cũng có thể được đưa vào bằng cách, ví dụ, xử lý bằng tác nhân gây đột biến. Các ví dụ về quá trình xử lý bằng tác nhân gây đột biến bao gồm sự chiếu tia X, sự chiếu tia cực tím, và quá trình xử lý bằng tác nhân gây đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), etyl metansulfonat (EMS), và metyl metansulfonat (MMS). Hơn nữa, sự đột biến ngẫu nhiên có thể được thực hiện bằng cách xử lý trực tiếp ADN in vitro bằng hydroxylamin. Sự tăng cường hoạt tính đặc trưng có thể được sử dụng độc lập, hoặc có thể được sử dụng theo sự kết hợp bất kỳ với các phương pháp gia tăng mức biểu hiện gen như nêu trên.

Phương pháp biến nạp không bị giới hạn một cách cụ thể, và các phương pháp thông thường đã biết có thể được sử dụng. Có thể được sử dụng là, ví dụ, phương pháp xử lý các tế bào nhận bằng canxi clorua để gia tăng tính thấm của nó đối với ADN, mà đã được áp dụng cho chủng *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 1970, 53, 159-162), và phương pháp điều chế các tế bào khả biến từ các tế bào mà đang ở pha sinh trưởng, sau đó biến nạp với ADN, mà đã được áp dụng cho *Bacillus subtilis* (Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1977, 1:153-167). Theo cách khác, có thể sử dụng phương pháp tạo ra các tế bào nhận AND trong các hạt nguyên sinh hoặc các hạt cầu, mà có thể dễ dàng hấp thu AND tái tổ hợp, sau đó đưa ADN tái tổ hợp vào

trong các tế bào nhận ADN, mà đã biết là có thể áp dụng cho *Bacillus subtilis*, xạ khuẩn, và nấm men (Chang, S. and Choen, S.N., 1979, Mol. Gen. Genet., 168:111-115; Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., 1978, Nature, 274:398-400; Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929-1933). Hơn nữa, phương pháp xung điện được áp dụng cho vi khuẩn coryneform (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 2-207791) cũng có thể được sử dụng.

Sự gia tăng hoạt tính của protein có thể được xác nhận bằng cách đo hoạt tính của protein.

Sự gia tăng hoạt tính của protein cũng có thể được xác nhận bằng cách xác nhận sự gia tăng mức biểu hiện của gen mã hóa protein. Sự gia tăng mức biểu hiện của gen có thể được xác nhận bằng cách xác nhận sự gia tăng mức phiên mã của gen, hoặc bằng cách xác nhận sự gia tăng lượng protein được biểu hiện từ gen.

Sự gia tăng mức phiên mã của gen có thể được xác nhận bằng cách so sánh lượng ARN thông tin được phiên mã từ gen này với chủng không được cải biến như chủng kiểu dại hoặc chủng cha mẹ. Các ví dụ về phương pháp đánh giá lượng ARN thông tin bao gồm phép lai Northern, RT-PCR, và v.v. (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual/Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Lượng ARN thông tin có thể tăng đến mức, ví dụ, bằng hoặc lớn hơn 1,5 lần, bằng hoặc lớn hơn 2 lần, hoặc bằng hoặc lớn hơn 3 lần lượng ARN thông tin của chủng không được cải biến.

Sự gia tăng về lượng protein có thể được xác nhận bằng phép thấm tách Western sử dụng các kháng thể (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Lượng protein (như số lượng phân tử protein trong mỗi tế bào) có thể gia tăng đến mức, ví dụ, bằng hoặc lớn hơn 1,5 lần, bằng hoặc lớn hơn 2 lần, hoặc bằng hoặc lớn hơn 3 lần lượng protein của chủng không được cải biến.

Các phương pháp gia tăng hoạt tính của protein có thể được sử dụng để tăng cường các hoạt tính của các protein bất kỳ như các enzym sinh tổng hợp

axit L-amin, và tăng cường mức biểu hiện của bất kỳ các gen như các gen mã hóa các protein bất kỳ đó, ngoài sự tăng cường hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic.

<1-4> Phương pháp giảm hoạt tính của protein

Sau đây, các phương pháp giảm hoạt tính của protein sẽ được giải thích.

Cụm từ "hoạt tính của protein được giảm" có nghĩa là hoạt tính của protein được giảm so với chủng không được cải biến. Cụ thể, cụm từ "hoạt tính của protein được giảm" có nghĩa là hoạt tính của protein cho mỗi tế bào được giảm so với hoạt tính của protein của chủng không được cải biến. Thuật ngữ "chủng không được cải biến" được sử dụng ở đây để chỉ chủng đối chứng mà không được cải biến sao cho hoạt tính của protein mong muốn được giảm. Các ví dụ về chủng không được cải biến bao gồm chủng kiểu dại và chủng cha mẹ. Các ví dụ cụ thể về chủng không được cải biến bao gồm các chủng chuẩn tương ứng của các loài vi khuẩn. Các ví dụ cụ thể về chủng không được cải biến còn bao gồm các chủng được lấy làm ví dụ ở trên trong phần mô tả về vi khuẩn. tức là, theo một phương án, hoạt tính của protein có thể được giảm so với chủng chuẩn, nghĩa là chủng chuẩn của loài mà vi khuẩn theo sáng chế nằm trong đó. Theo phương án khác, hoạt tính của protein còn có thể được giảm so với chủng *C. glutamicum* ATCC 13032. Theo phương án khác, hoạt tính của protein cũng có thể được giảm so với chủng *C. glutamicum* 2256 (ATCC 13869). Theo phương án khác, hoạt tính của protein cũng có thể được giảm so với chủng *E. coli* K-12 MG1655. Theo phương án khác nữa, hoạt tính của protein cũng có thể được giảm so với chủng *P. ananatis* AJ13355. Tình trạng mà "hoạt tính của protein được giảm" cũng bao gồm trình trạng mà hoạt tính của protein đã biến mất hoàn toàn. Cụ thể hơn, cụm từ "hoạt tính của protein được giảm" có thể có nghĩa là số lượng phân tử của protein cho mỗi tế bào được giảm, và/hoặc chức năng của từng phân tử protein được giảm so với chủng không được cải biến. Tức là, thuật ngữ "hoạt tính" trong cụm từ "hoạt tính của protein được giảm" không bị giới hạn ở hoạt tính xúc tác của protein, nhưng cũng có thể có nghĩa là mức phiên mã của gen (nghĩa là lượng ARN thông tin) mã hóa protein hoặc mức dịch mã của protein (nghĩa là lượng protein). Tình trạng mà "số lượng phân tử của protein cho

mỗi tế bào được giảm" cũng bao gồm tình trạng mà hoàn toàn không có protein. Tình trạng mà "chức năng của mỗi phân tử protein được giảm" còn bao gồm tình trạng mà chức năng của mỗi phân tử protein đã hòa toàn biến mất. Mức độ giảm hoạt tính của protein không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là hoạt tính được giảm so với hoạt tính của chủng không được cải biến. Hoạt tính của protein có thể được giảm đến mức, ví dụ, bằng hoặc nhỏ hơn 50%, bằng hoặc nhỏ hơn 20%, bằng hoặc nhỏ hơn 10%, bằng hoặc nhỏ hơn 5%, hoặc 0% so với hoạt tính protein của chủng không được cải biến.

Sự cải biến để giảm hoạt tính của protein có thể đạt được bằng cách, ví dụ, giảm mức biểu hiện của gen mã hóa protein. Cụm từ "mức biểu hiện của gen được giảm" có nghĩa là mức biểu hiện của gen được giảm so với chủng không được cải biến như chủng kiểu dại và chủng cha mẹ. Cụ thể, cụm từ "mức biểu hiện của gen được giảm" có nghĩa là mức biểu hiện của gen cho mỗi tế bào được giảm so với mức biểu hiện của gen ở chủng không được cải biến. Cụ thể hơn, cụm từ "mức biểu hiện của gen được giảm" có thể có nghĩa là mức phiên mã của gen (tức là lượng ARN thông tin) được giảm, và/hoặc mức dịch mã của gen (tức là lượng protein được biểu hiện từ gen) được giảm. Tình trạng mà "mức biểu hiện của gen được giảm" còn bao gồm tình trạng mà gen hoàn toàn không được biểu hiện. Tình trạng mà "mức biểu hiện của gen được giảm" còn được coi là "mức biểu hiện của gen bị suy giảm". Mức biểu hiện của gen có thể được giảm đến, ví dụ, bằng hoặc nhỏ hơn 50%, bằng hoặc nhỏ hơn 20%, bằng hoặc nhỏ hơn 10%, bằng hoặc nhỏ hơn 5%, hoặc 0% so với mức biểu hiện của gen của chủng không được cải biến.

Sự giảm mức biểu hiện gen có thể là do, ví dụ, sự giảm hiệu suất phiên mã, sự giảm hiệu suất dịch mã, hoặc sự kết hợp của hai sự giảm nêu trên. Mức biểu hiện của gen có thể được giảm bằng cách cải biến trình tự điều chỉnh mức biểu hiện của gen như đoạn khởi đầu, chuỗi Shine-Dalgarno (SD) (còn được gọi là vị trí liên kết ribosom (RBS)), và vùng đệm giữa RBS và codon khởi đầu của gen. Khi trình tự điều chỉnh mức biểu hiện được cải biến, tốt hơn là một hoặc nhiều nucleotit, tốt hơn nữa là hai hoặc nhiều nucleotit, tốt nhất là ba hoặc nhiều nucleotit, của trình tự điều chỉnh mức biểu hiện được cải biến. Ví dụ, hiệu suất

phiên mã của gen có thể được giảm bằng cách, ví dụ, thay thế đoạn khởi đầu của gen trên nhiễm sắc thể bằng đoạn khởi đầu yếu hơn. Thuật ngữ “đoạn khởi đầu yếu hơn” có nghĩa là đoạn khởi đầu có sự phiên mã được giảm của gen so với đoạn khởi đầu kiểu dại sẵn có của gen. Các ví dụ về các đoạn khởi đầu yếu hơn bao gồm, ví dụ, các đoạn khởi đầu cảm ứng. Tức là, đoạn khởi đầu cảm ứng có thể có chức năng như đoạn khởi đầu yếu hơn trong điều kiện không cảm ứng được, như không có mặt tác nhân gây cảm ứng tương ứng. Hơn nữa, một phần hoặc toàn bộ trình tự điều chỉnh mức biểu hiện có thể được loại bỏ. Mức biểu hiện của gen cũng có thể được giảm bằng cách, ví dụ, xử lý yếu tố chịu trách nhiệm điều chỉnh sự biểu hiện. Các ví dụ về yếu tố chịu trách nhiệm về sự biểu hiện bao gồm các phân tử thấp chịu trách nhiệm điều chỉnh sự dịch mã hoặc phiên mã (các tác nhân gây cảm ứng, các tác nhân ức chế, v.v.), các protein chịu trách nhiệm điều chỉnh sự dịch mã hoặc phiên mã (các yếu tố phiên mã v.v.), các axit nucleic chịu trách nhiệm điều chỉnh sự dịch mã hoặc phiên mã (siARN v.v.), và tương tự. Hơn nữa, mức biểu hiện của gen cũng có thể được giảm bằng cách, ví dụ, đưa sự đột biến mà làm giảm mức biểu hiện của gen vào trong vùng mã hóa của gen. Ví dụ, mức biểu hiện của gen có thể được giảm bằng cách thay thế codon trong vùng mã hóa của gen bằng codon cùng nghĩa được sử dụng với tần suất ít hơn trong vật chủ. Hơn nữa, ví dụ, mức biểu hiện gen có thể được giảm nhờ làm đứt gãy gen như được mô tả dưới đây.

Sự cải biến để làm giảm hoạt tính của protein cũng có thể đạt được bằng cách, ví dụ, làm đứt gãy gen mã hóa protein. Cụm từ “gen bị làm đứt gãy” có nghĩa là gen được cải biến sao cho protein mà có thể có chức năng bình thường không được tạo ra. Tình trạng “protein mà có các chức năng bình thường không được tạo ra” bao gồm tình trạng mà protein hoàn toàn không được sinh ra từ gen, và tình trạng mà protein mà chức năng (như hoạt tính hoặc đặc tính) cho mỗi phân tử được giảm hoặc được loại trừ được tạo ra từ gen.

Sự đứt gãy gen có thể đạt được bằng cách, ví dụ, loại bỏ gen trên nhiễm sắc thể. Thuật ngữ “loại bỏ gen” để chỉ sự loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng mã hóa của gen. Hơn nữa, toàn bộ gen bao gồm các chuỗi hướng lên trên và hướng xuống dưới từ vùng mã hóa của gen trên nhiễm sắc thể có thể được loại

bỏ. Vùng được loại bỏ có thể là vùng bất kỳ như vùng có đầu tận cùng N (vùng mã hóa vùng có đầu tận cùng N của protein), vùng bên trong, hoặc vùng có đầu tận cùng C (vùng mã hóa vùng có đầu tận cùng C của protein), miễn là hoạt tính của protein có thể được giảm. Sự loại bỏ vùng dài hơn chắc chắn sẽ gây ra sự bất hoạt gen. Vùng được loại bỏ có thể là, ví dụ, vùng có độ dài bằng hoặc lớn hơn 10%, bằng hoặc lớn hơn 20%, bằng hoặc lớn hơn 30%, bằng hoặc lớn hơn 40%, bằng hoặc lớn hơn 50%, bằng hoặc lớn hơn 60%, bằng hoặc lớn hơn 70%, bằng hoặc lớn hơn 80%, bằng hoặc lớn hơn 90%, hoặc bằng hoặc lớn hơn 95% so với tổng độ dài của vùng mã hóa của gen. Hơn nữa, tốt hơn là khung đọc của các trình tự hướng lên dòng trên và hướng xuống dòng dưới từ vùng được loại bỏ là không giống nhau. Sự không nhất quán giữa các khung đọc có thể gây ra sự dịch khung hướng xuống dòng dưới của vùng được loại bỏ.

Sự đứt gãy gen cũng có thể đạt được bằng cách, ví dụ, đưa sự đột biến để thay thế axit amin (sự đột biến nhầm nghĩa), codon kết thúc (sự đột biến vô nghĩa), sự thêm hoặc loại bỏ một hoặc hai gốc nucleotit (sự đột biến dịch khung), hoặc tương tự vào trong vùng mã hóa của gen trên nhiễm sắc thể (Journal of Biological Chemistry, 272:8611-8617 (1997); Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 95 5511-5515 (1998); Journal of Biological Chemistry, 26 116, 20833-20839 (1991)).

Sự đứt gãy gen cũng có thể đạt được bằng cách, ví dụ, xen trình tự nucleotit khác vào trong vùng mã hóa của gen trên nhiễm sắc thể. Vị trí xen có thể là ở vùng vật kỳ của gen, và sự xen trình tự nucleotit dài hơn chắc chắn sẽ làm bất hoạt gen đó. Tốt hơn là các khung đọc của trình tự hướng lên dòng trên và hướng xuống dòng dưới từ vị trí xen là không giống nhau. Sự không nhất quán của các khung đọc có thể gây ra sự dịch khung hướng xuống dòng dưới của vùng được loại bỏ. Trình tự nucleotit khác không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là trình tự mà làm giảm hoặc loại trừ hoạt tính của protein được mã hóa được chọn, và các ví dụ của nó bao gồm, ví dụ, gen đánh dấu như các gen kháng kháng sinh, và gen hữu ích cho sự sản xuất chất mong muốn.

Cụ thể, sự làm đứt gãy gen có thể được thực hiện sao cho trình tự axit amin của protein được mã hóa được loại bỏ. Nói cách khác, sự cải biến để làm

giảm hoạt tính của protein có thể đạt được bằng cách, ví dụ, loại bỏ trình tự axit amin của protein, cụ thể, cải biến gen để mã hóa protein mà có trình tự axit amin được loại bỏ. Thuật ngữ “sự loại bỏ trình tự axit amin của protein” là để chỉ sự loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng trình tự axit amin của protein. Ngoài ra, thuật ngữ “loại bỏ trình tự axit amin của protein” có nghĩa là trình tự axit amin ban đầu biến mất trong protein, và cũng bao gồm trường hợp trong đó trình tự axit amin ban đầu được thay đổi thành trình tự axit amin khác. Tức là, ví dụ, vùng mà được thay đổi thành trình tự axit amin khác bởi sự dịch khung có thể được coi là vùng được loại bỏ. Khi trình tự axit amin của protein được loại bỏ, chiều dài toàn phần của protein bị rút ngắn, nhưng cũng có thể có trường hợp ở đó chiều dài toàn phần của protein không thay đổi hoặc được giãn dài ra. Ví dụ, bằng cách loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng mã hóa của gen, vùng được mã hóa bởi vùng được loại bỏ có thể được loại bỏ trong protein được mã hóa. Ngoài ra, ví dụ, bằng cách đưa codon kết thúc vào trong vùng mã hóa của gen, vùng được mã hóa bởi vùng hướng xuống dòng dưới của vị trí đưa vào có thể được loại bỏ trong protein được mã hóa. Ngoài ra, ví dụ, nhờ sự dịch khung ở vùng mã hóa của gen, vùng được mã hóa bởi vùng dịch khung có thể được loại bỏ trong protein được mã hóa. Các phần mô tả nêu trên liên quan đến vị trí và chiều dài của vùng được loại bỏ trong quá trình loại bỏ của gen có thể được áp dụng với các sự thay đổi cần thiết cho vị trí và chiều dài của vùng được loại bỏ trong quá trình loại bỏ trình tự axit amin của protein.

Sự cải biến gen trên nhiễm sắc thể như được mô tả ở trên có thể đạt được bằng cách, ví dụ, tạo ra gen kiểu đứt gãy được cải biến sao cho nó không thể tạo ra protein mà có chức năng thông thường, và biến nạp vật chủ với ADN tái tổ hợp chứa gen kiểu đứt gãy để gây ra quá trình tái tổ hợp tương đồng giữa gen kiểu đứt gãy và gen kiểu đại trên nhiễm sắc thể và bằng cách đó thay thế gen kiểu đại bằng gen kiểu đứt gãy trên nhiễm sắc thể. Trong quá trình này, nếu gen đánh dấu được chọn theo các đặc tính của vật chủ như sự khuyết dưỡng có liên quan đến ADN tái tổ hợp, quá trình này trở nên dễ dàng hơn. Các ví dụ về gen kiểu đứt gãy bao gồm gen mà một phần hoặc toàn bộ vùng mã hóa được loại bỏ, gen bao gồm sự đột biến nhằm nghĩa, gen bao gồm sự đột biến vô nghĩa, gen bao

gồm sự đột biến dịch khung, và gen được đưa vào với trình tự xen đoạn như gen nhảy hoặc gen đánh dấu. Protein được mã hóa bởi gen kiểu đứt gãy có cấu hình khác với cấu hình của protein kiểu đại, ngay cả khi nó được tạo thành, và như vậy chức năng của nó bị suy giảm hoặc được loại trừ. Gen làm đứt gãy trên cơ sở sự thay thế gen sử dụng quá trình tái tổ hợp tương đồng đã được tiến hành, và có các phương pháp ADN mạch thẳng như phương pháp được gọi là "Red driven integration" (sự đính gán được dẫn truyền bởi Red) (Datsenko, K.A, and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645 (2000)), và phương pháp sử dụng sự đính gán được dẫn truyền bởi Red kết hợp với hệ cắt thu được từ thể thực khuẩn λ (Cho, E.H., Gumpert, R.I., Gardner, J.F., J. Bacteriol., 184:5200-5203 (2002)) (tham khảo WO2005/010175), phương pháp sử dụng plasmit có điểm khởi đầu sao chép miễn cảm nhiệt độ, phương pháp sử dụng plasmit có khả năng vận chuyển tiếp hợp, phương pháp sử dụng vật truyền tự sát không có điểm khởi đầu sao chép mà có chức năng trong vật chủ (patent Mỹ số 6,303,383, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 05-007491), và tương tự.

Sự cải biến để làm giảm hoạt tính của protein cũng có thể đạt được bằng cách, ví dụ, xử lý bằng tác nhân gây đột biến. Các ví dụ về quá trình xử lý bằng tác nhân gây đột biến bao gồm sự chiếu tia X hoặc tia cực tím và quá trình xử lý bằng tác nhân gây đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), ethyl metansulfonat (EMS), và methyl metansulfonat (MMS).

Các phương pháp làm giảm hoạt tính của protein như nêu trên có thể được sử dụng một cách độc lập hoặc theo sự kết hợp bất kỳ.

Khi protein có chức năng như một phức hợp gồm nhiều cấu trúc siêu phân tử, một phần hoặc toàn bộ các cấu trúc siêu phân tử này có thể được cải biến, miễn là hoạt tính của protein được giảm. Tức là, ví dụ, một phần hoặc toàn bộ các gen mà mã hóa các cấu trúc siêu phân tử tương ứng có thể được là đứt gãy hoặc tương tự. Hơn nữa, khi có một loạt các isozym của protein, một phần hoặc hoàn bộ hoạt tính của các isozym này có thể được giảm, miễn là hoạt tính của protein được giảm. Tức là, ví dụ, một phần hoặc toàn bộ các gen mà mã hóa các isozym tương ứng có thể được làm đứt gãy hoặc tương tự.

Sự giảm hoạt tính của protein có thể được xác nhận bằng cách đo hoạt tính của protein.

Sự giảm hoạt tính của protein cũng có thể được xác nhận bằng cách xác nhận sự giảm mức biểu hiện của gen mã hóa protein. Sự giảm mức biểu hiện của gen có thể được xác nhận bằng cách xác nhận sự giảm mức phiên mã của gen hoặc sự giảm lượng protein được biểu hiện từ gen đó.

Sự giảm mức phiên mã của gen có thể được xác nhận bằng cách so sánh lượng ARN thông tin được phiên mã từ gen với lượng ARN thông tin của chủng không được cải biến. Các ví dụ về phương pháp đánh giá lượng ARN thông tin bao gồm phương pháp lai Northern, RT-PCR, và tương tự (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Lượng ARN thông tin tốt hơn là được giảm đến mức, ví dụ, bằng hoặc nhỏ hơn 50%, bằng hoặc nhỏ hơn 20%, bằng hoặc nhỏ hơn 10%, bằng hoặc nhỏ hơn 5%, hoặc 0% so với lượng ARN thông tin của chủng không được cải biến.

Sự giảm lượng protein có thể được xác nhận phương pháp thẩm tách Western sử dụng các kháng thể (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA) 2001). Lượng protein (như số lượng phân tử của protein trên mỗi tế bào) tốt hơn là được giảm đến mức, ví dụ, bằng hoặc nhỏ hơn 50%, bằng hoặc nhỏ hơn 20%, bằng hoặc nhỏ hơn 10%, bằng hoặc nhỏ hơn 5%, hoặc 0% so với lượng protein của chủng không được cải biến.

Sự làm đứt gãy gen có thể được xác nhận bằng cách xác định trình tự nucleotit của một phần hoặc toàn bộ gen, bản đồ enzym giới hạn, độ dài đầy đủ, hoặc tương tự của gen phụ thuộc vào cách thức được sử dụng để làm đứt gãy.

Các phương pháp để làm giảm hoạt tính của protein như nêu trên có thể được áp dụng để làm giảm các hoạt tính của các protein bất kỳ như enzym mà xúc tác phản ứng tách ra từ chu trình sinh tổng hợp của axit L-amin mong muốn để tạo ra hợp chất khác với axit L-amin mong muốn, và giảm mức biểu hiện của các gen bất kỳ như các gen mã hóa các protein bất kỳ đó.

<2> Phương pháp sản xuất axit L-amin sáng chế

Phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất axit L-amin bao

gồm bước nuôi cấy vi khuẩn theo sáng chế trong môi trường để tích tụ axit L-amin trong môi trường này và/hoặc các tế bào của vi khuẩn, và thu gom axit L-amin từ môi trường nuôi cấy và/hoặc các tế bào của vi khuẩn. Axit L-amin được sản xuất trong sáng chế là axit L-amin khác với axit L-aspartic. Theo sáng chế, một loại axit L-amin có thể được sản xuất, hoặc hai hoặc nhiều loại axit L-amin có thể được sản xuất.

Môi trường được sử dụng không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là vi khuẩn theo sáng chế có thể sinh trưởng trong môi trường này, và axit L-amin mong muốn có thể được tạo ra. Để làm môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường thường được sử dụng để nuôi cấy các vi khuẩn như vi khuẩn coryneform và vi khuẩn *Enterobacteriaceae* có thể được sử dụng. Để làm môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, và nguồn lưu huỳnh, cũng như các thành phần được chọn từ các thành phần hữu cơ và các thành phần vô cơ khác nhau nếu cần có thể được sử dụng. Loại và nồng độ của các thành phần môi trường có thể được xác định theo các điều kiện khác nhau như loại vi khuẩn được sử dụng.

Các ví dụ cụ thể về nguồn cacbon bao gồm, ví dụ, sacarit như glucoza, fructoza, sucroza, lactoza, galactoza, xyloza, arabinoza, mật mía, chất thủy phân của tinh bột, và chất thủy phân của sinh khối, các axit hữu cơ như axit axetic, axit fumaric, axit xitric, và axit succinic, các rượu như glyxerol, glyxerol nguyên liệu, và etanol, và các axit béo. Để làm nguồn cacbon, các nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật có thể được ưu tiên sử dụng. Các ví dụ về thực vật bao gồm, ví dụ, ngô, lúa, lúa mì, đậu tương, mía, củ cải, và cây bông. Các ví dụ về các nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật bao gồm, ví dụ, các bộ phận như rễ, cuống, thân, cành, lá, hoa, và hạt, thân thực vật bao gồm các bộ phận nêu trên, và các sản phẩm phân hủy của các bộ phận thực vật này. Các dạng của các nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật ở thời điểm sử dụng không bị giới hạn một cách cụ thể, và chúng có thể được sử dụng ở dạng bất kỳ như sản phẩm chưa được xử lý, nước ép, sản phẩm nghiền, và sản phẩm được tinh chế. Các pentoza như xyloza, các hexoza như glucoza, hoặc các hỗn hợp của chúng có thể thu được từ, ví dụ, sinh khối thực vật, và được sử dụng. Cụ thể, các sacarit này có thể thu được bằng

cách cho sinh khối thực vật đi xử lý như xử lý hơi nước, thủy phân bằng axit đậm đặc, thủy phân bằng axit loãng, thủy phân bằng enzym như xenlulaza, và xử lý kiềm. Vì hemixenluloza thường được thủy phân dễ dàng hơn so với xenluloza, hemixenluloza trong sinh khối thực vật có thể được thủy phân trước để giải phóng các pentoza, và sau đó xenluloza có thể được thủy phân để tạo ra hexoza. Hơn nữa, xyloza có thể được cung cấp bằng cách chuyển hóa từ hexoza bằng cách, ví dụ, truyền chu trình chuyển hóa hexoza như glucoza thành xyloza vào trong vi khuẩn theo sáng chế. Để làm nguồn cacbon, một loại nguồn cacbon riêng biệt có thể được sử dụng, hoặc có thể sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều loại nguồn cacbon.

Các ví dụ cụ thể về nguồn nitơ bao gồm, ví dụ, các muối amoni như amoni sulfat, amoni clorua, và amoni phosphat, các nguồn nitơ hữu cơ như pepton, dịch chiết nấm men, dịch chiết thịt, và các sản phẩm phân hủy protein đậu tương, amoniac, và ure. Khí amoniac hoặc nước amoniac được sử dụng để điều chỉnh độ pH cũng có thể được sử dụng làm nguồn nitơ. Để làm nguồn nitơ, một loại nguồn nitơ riêng biệt có thể được sử dụng, hoặc có thể sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều loại nguồn nitơ.

Các ví dụ cụ thể về nguồn phosphat bao gồm, ví dụ, các muối của axit phosphoric như kali dihydrogenphosphat và dikali hydrogenphosphat, và các polyme của axit phosphoric như axit pyrophosphoric. Để làm nguồn phosphat, một loại nguồn phosphat riêng biệt có thể được sử dụng, hoặc có thể sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều loại nguồn phosphat.

Các ví dụ cụ thể về nguồn lưu huỳnh bao gồm, ví dụ, các hợp chất lưu huỳnh vô cơ như các sulfat, các thiosulfat, và các sulfit, và các axit amin chứa lưu huỳnh như xystein, xystin, và glutathion. Để làm nguồn lưu huỳnh, một loại nguồn lưu huỳnh riêng biệt có thể được sử dụng, hoặc có thể sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều loại nguồn lưu huỳnh.

Các ví dụ cụ thể về các thành phần hữu cơ và các thành phần vô cơ khác nhau bao gồm, ví dụ, các muối vô cơ như natri clorua và kali clorua; các kim loại vết như sắt, mangan, magie, và canxi; các vitamin như vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, axit nicotinic, nicotinamit, và vitamin B12; các axit amin; các axit

nucleic; và các thành phần hữu cơ chứa các chất này như pepton, axit casamino, dịch chiết nấm men, và sản phẩm phân hủy protein đậu tương. Để làm các thành phần hữu cơ và thành phần vô cơ khác nhau, một loại thành phần riêng biệt có thể được sử dụng, hoặc có thể sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều loại thành phần.

Hơn nữa, khi đột biến khuyết dưỡng mà có nhu cầu axit amin hoặc chất tương tự cho sự sinh trưởng của nó được sử dụng, tốt hơn là cung cấp chất dinh dưỡng cần thiết vào môi trường nuôi cấy.

Hơn nữa, tốt hơn là, ví dụ, giới hạn lượng biotin trong môi trường, hoặc bổ sung chất hoạt động bề mặt hoặc penixilin vào môi trường.

Các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là vi khuẩn theo sáng chế có thể phát triển được, và axit L-amin mong muốn có thể được sản xuất. Quá trình nuôi cấy có thể được tiến hành, ví dụ, trong các điều kiện thông thường được sử dụng để nuôi cấy các vi khuẩn như vi khuẩn coryneform và vi khuẩn *Enterobacteriaceae*. Các điều kiện nuôi cấy có thể được thiết lập thích hợp theo các điều kiện khác nhau như loại vi khuẩn được sử dụng.

Quá trình nuôi cấy có thể được tiến hành bằng cách sử dụng môi trường lỏng. Ở thời điểm nuôi cấy, vi khuẩn theo sáng chế được nuôi cấy trên môi trường rắn như môi trường thạch có thể được cấy trực tiếp vào trong môi trường lỏng, hoặc vi khuẩn theo sáng chế được nuôi cấy trong môi trường lỏng như nuôi cấy mầm có thể được cấy vào trong môi trường lỏng cho quá trình nuôi cấy chính. Tức là, quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện một cách riêng biệt như nuôi cấy mầm và nuôi cấy chính. Trong trường hợp này, các điều kiện nuôi cấy của quá trình nuôi cấy mầm và nuôi cấy chính có thể là giống hoặc không giống nhau. Lượng vi khuẩn theo sáng chế có trong môi trường này ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy không bị giới hạn một cách cụ thể. Quá trình nuôi cấy chính có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, cấy dịch nuôi cấy mầm vào môi trường cho quá trình nuôi cấy chính ở lượng từ 1 đến 50% (thể tích/thể tích).

Quá trình nuôi cấy có thể được tiến hành dưới dạng nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy theo mẻ-cấp liệu, nuôi cấy liên tục, hoặc sự kết hợp các quá trình nuôi cấy này. Môi trường được sử dụng ở thời điểm bắt đầu quá trình nuôi cấy còn được gọi là "môi trường khởi đầu". Môi trường được cấp cho hệ thống nuôi cấy

(thùng lên men) trong quá trình nuôi cấy theo mẻ-cấp liệu hoặc quá trình nuôi cấy liên tục còn được gọi là "môi trường cấp liệu". Hơn nữa, để cấp môi trường cấp liệu vào hệ thống nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy theo mẻ-cấp liệu hoặc quá trình nuôi cấy liên tục còn được gọi là "cấp liệu". Hơn nữa, khi quá trình nuôi cấy được tiến hành riêng biệt như quá trình nuôi cấy mầm và quá trình nuôi cấy chính, ví dụ, cả quá trình nuôi cấy mầm và quá trình nuôi cấy chính có thể được thực hiện dưới dạng quá trình nuôi cấy theo mẻ. Theo cách khác, ví dụ, quá trình nuôi cấy mầm có thể được thực hiện như nuôi cấy theo mẻ, và quá trình nuôi cấy chính có thể được thực hiện như quá trình nuôi cấy theo mẻ-cấp liệu hoặc quá trình nuôi cấy liên tục.

Trong sáng chế, các thành phần môi trường mà mỗi thành phần có thể được chứa trong môi trường khởi đầu, môi trường cấp liệu, hoặc cả hai môi trường này. Các loại thành phần được chứa trong môi trường khởi đầu có thể là giống hoặc có thể không giống các loại thành phần được chứa trong môi trường cấp liệu. Nồng độ của từng thành phần được chứa trong môi trường khởi đầu có thể là giống hoặc có thể không giống nồng độ của thành phần được chứa trong môi trường cấp liệu. Hơn nữa, hai hoặc nhiều loại môi trường cấp liệu chứa các loại thành phần khác nhau và/hoặc các nồng độ thành phần khác nhau có thể được sử dụng. Ví dụ, khi môi trường được cấp liệu gián đoạn nhiều lần, các loại và/hoặc các nồng độ của các thành phần được chứa trong các môi trường cấp liệu có thể là giống hoặc có thể không giống nhau cho từng quá trình cấp liệu.

Nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường này không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là vi khuẩn theo sáng chế có thể phát triển và sản xuất axit L-amin. Nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường này có thể cao ngang với phạm vi mà sự sản xuất axit L-amin không bị ức chế. Nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường có thể là, như nồng độ ban đầu (nồng độ trong môi trường khởi đầu), ví dụ, từ 1 đến 30% (trọng lượng/thể tích), tốt hơn là từ 3 đến 10% (trọng lượng/thể tích). Hơn nữa, nguồn cacbon có thể được cấp bổ sung vào môi trường nếu cần. Ví dụ, nguồn cacbon có thể được cấp bổ sung vào môi trường tỷ lệ thuận với sự tiêu thụ nguồn cacbon cùng với tiến độ của quá trình lên men.

Quá trình nuôi cấy có thể được tiến hành, ví dụ, trong điều kiện hiếu khí.

Thuật ngữ “điều kiện hiếu khí” là để chỉ điều kiện trong đó nồng độ oxy hòa tan trong môi trường lỏng không thấp hơn 0,33ppm, là giới hạn phát hiện để phát hiện bằng điện cực màng oxy, hoặc có thể tốt hơn là điều kiện ở đó nồng độ oxy hòa tan trong môi trường lỏng không thấp hơn 1,5ppm. Nồng độ oxy có thể được điều chỉnh đến, ví dụ, từ 5 đến 50%, tốt hơn là khoảng 10% nồng độ oxy bão hòa. Cụ thể, quá trình nuôi cấy dưới điều kiện hiếu khí có thể được tiến hành bằng cách nuôi cấy thông khí, nuôi cấy rung, nuôi cấy có khuấy, hoặc kết hợp các quá trình nuôi cấy này. Độ pH của môi trường có thể là, ví dụ, từ 3 đến 10, tốt hơn là từ 4,0 đến 9,5. Trong quá trình nuôi cấy, độ pH của môi trường có thể được điều chỉnh nếu cần. Độ pH của môi trường có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng các chất kiềm và chất axit khác nhau như khí amoniac, nước amoniac, natri carbonat, natri bicarbonat, kali carbonat, kali bicarbonat, magie carbonat, natri hydroxit, canxi hydroxit, và magie hydroxit. Nhiệt độ nuôi cấy có thể là, ví dụ, từ 20 đến 45°C, tốt hơn là từ 25 đến 37°C. Thời gian nuôi cấy có thể là, ví dụ, từ 10 đến 120 giờ. Quá trình nuôi cấy có thể là liên tục cho đến khi nguồn cacbon có trong môi trường này được tiêu thụ, hoặc cho đến khi vi khuẩn theo sáng chế hao hết hoạt tính. Bằng cách nuôi cấy vi khuẩn theo sáng chế trong các điều kiện như được mô tả ở trên, axit L-amin được tích tụ trong môi trường này và/hoặc trong các tế bào của vi khuẩn.

Hơn nữa, khi axit L-glutamic được sản xuất, quá trình nuôi cấy có thể được tiến hành bằng cách sử dụng môi trường lỏng được điều chỉnh để thỏa mãn điều kiện trong đó axit L-glutamic được kết tủa, trong khi kết tủa axit L-glutamic trong môi trường. Các ví dụ về điều kiện trong đó axit L-glutamic được kết tủa bao gồm, ví dụ, độ pH = 5,0 đến 4,0, tốt hơn là độ pH = 4,5 đến 4,0, tốt hơn nữa là độ pH = 4,3 đến 4,0, tốt nhất là ở độ pH khoảng 4,0 (EP1078989A).

Sự sản xuất axit L-amin có thể được xác nhận bằng các phương pháp đã biết được sử dụng để phát hiện hoặc nhận biết các hợp chất. Các ví dụ về các phương pháp như vậy bao gồm, ví dụ, HPLC, LC/MS, GC/MS, và NMR. Các phương pháp này có thể được sử dụng một cách độc lập, hoặc có thể được sử dụng kết hợp một cách thích hợp.

Axit L-amin được tạo ra có thể được thu gom từ môi trường lỏng lên men

bằng các phương pháp đã biết được sử dụng để tách và tinh chế các hợp chất. Các ví dụ về các phương pháp như vậy bao gồm, ví dụ, phương pháp nhựa trao đổi ion (Nagai, H. et al., Separation Science and Technology, 39(16), 3691-3710), kết tủa, tách màng (đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 9-164323 và đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (Kokai) số 9-173792), và kết tinh (WO2008/078448 và WO2008/078646). Các phương pháp này có thể được sử dụng độc lập, hoặc có thể được sử dụng kết hợp một cách thích hợp. Khi axit L-amin được tích tụ trong các tế bào của vi khuẩn, ví dụ, các tế bào có thể được phá vỡ bằng sóng siêu âm hoặc tương tự, phần nổi lên trên bề mặt có thể thu được bằng cách loại bỏ các tế bào khỏi huyền phù chứa tế bào bị phá vỡ bằng cách li tâm, và axit L-amin có thể được thu gom từ phần nổi lên trên bề mặt bằng phương pháp nhựa trao đổi ion hoặc phương pháp tương tự. Axit L-amin được thu gom có thể là hợp chất tự do, muối của nó, hoặc hỗn hợp của nó. Các ví dụ về muối bao gồm, ví dụ, sulfat, hydroclorua, carbonat, muối amoni, muối natri, và muối kali. Khi axit L-glutamic được tạo ra, axit L-glutamic được thu gom có thể là, ví dụ, axit L-glutamic tự do, natri L-glutamat (mononatri L-glutamat, MSG), amoni L-glutamat (monoamoni L-glutamat), hoặc hỗn hợp của các hợp chất này. Ví dụ, mononatri L-glutamat (MSG) có thể thu được bằng cách bổ sung axit vào môi trường lỏng lên men để kết tinh amoni L-glutamat có trong đó, và sau đó bằng cách bổ sung lượng đẳng mol của natri hydroxit vào các tinh thể. Ngoài ra, sự khử màu có thể được tiến hành bằng cách sử dụng than hoạt tính trước và/hoặc sau khi kết tinh (xem, Tetsuya KAWAKITA, "Industrial Crystallization for Mononatri L-Glutamate.", Bulletin of the Society of Sea Water Science, Japan, Vol.56:5). Tinh thể mononatri L-glutamat có thể được sử dụng như, ví dụ, gia vị umami. Tinh thể mononatri L-glutamat cũng có thể được sử dụng là gia vị kết hợp với axit nucleic như natri guanylat và natri inosinat, mà cũng có vị umami.

Khi axit L-amin được kết tủa trong môi trường, axit này có thể được thu gom bằng cách li tâm, lọc, hoặc tương tự. Axit L-amin kết tủa trong môi trường này cũng có thể được tách cùng với axit L-amin hòa tan trong môi trường, sau đó axit L-amin hòa tan trong môi trường này được kết tinh.

Axit L-amin được thu gom có thể chứa các thành phần như các tế bào vi khuẩn, các thành phần môi trường, độ ẩm, và sản phẩm phụ trao đổi chất của vi khuẩn ngoài axit L-amin. Axit L-amin thu gom được cũng có thể được tinh chế đến mức mong muốn. Độ tinh khiết của axit L-amin được thu gom có thể là, ví dụ, bằng hoặc cao hơn 50% (trọng lượng/trọng lượng), tốt hơn là bằng hoặc cao hơn 85% (trọng lượng/trọng lượng), tốt nhất là bằng hoặc cao hơn 95% (trọng lượng/trọng lượng) (JP1214636B, USP5,431,933, USP4,956,471, USP4,777,051, USP4,946,654, USP5,840,358, USP6,238,714, và US2005/0025878).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được giải thích cụ thể hơn với sự tham khảo các ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ: Quy trình nuôi cấy sản xuất axit glutamic sử dụng chủng *Corynebacterium glutamicum* có mức biểu hiện được gia tăng của gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic

Trong ví dụ này, sự sản xuất axit glutamic có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chủng sản xuất axit glutamic *C. glutamicum* được đưa vào với gen mã hóa vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic có khả năng hấp thu axit aspartic (Cg-dctA, Ec-dctA, Ec-dcuA, hoặc Ec-dcuB), và hiệu quả của sự gia tăng mức biểu hiện của gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic đối với sự sản xuất axit glutamic được đánh giá.

(1) Nguyên liệu

Các nguyên liệu được sử dụng trong ví dụ này là như sau.

Bảng 1: Đoạn môi được sử dụng

Đoạn môi	SEQ ID NO	Trình tự nucleotit (5'→3')
1	1	CCAAGCTTGCATGCCAGGAGGATTATAATGGATTCAAACACAGAATCTTC
2	2	CGGTACCCGGGGATCCTAGTGGTCTTCTTCTAACTCCAC
3	3	CCAAGCTTGCATGCCAGGAGGATTATAATGAAAACCTCTCTGTTTAAAGCC
4	4	CGGTACCCGGGGATCTTAAGAGGATAATTCGTGCG

5	5	CCAAGCTTGCATGCCAGGAGGATTATAATGCTAGTTGTAGAACTCATCATAG
6	6	CGGTACCCGGGGATCTTACAGCATGAAGCTACCCAGCACG
7	7	CCAAGCTTGCATGCCAGGAGGATTATAATGTTATTTACTATCCAACTTATC
8	8	CGGTACCCGGGGATCTTATAAGAACCCGTACATCGCGGCG

<Plasmid được sử dụng>

pVK9 (KmR; US2006-0141588)

pVK9-Cg-dctA (KmR; đơn yêu cầu cấp patent này)

pVK9-Ec-dctA (KmR; đơn yêu cầu cấp patent này)

pVK9-Ec-dcuA (KmR; đơn yêu cầu cấp patent này)

pVK9-Ec-dcuB (KmR; đơn yêu cầu cấp patent này)

<Chủng được sử dụng>

C. glutamicum 2256 Δ sucA Δ ldhA *yggB** (WO2014/185430)

C. glutamicum 2256 Δ sucA Δ ldhA *yggB**/pVK9 (đơn yêu cầu cấp patent này)

C. glutamicum 2256 Δ sucA Δ ldhA *yggB**/pVK9-Cg-dctA (đơn yêu cầu cấp patent này)

C. glutamicum 2256 Δ sucA Δ ldhA *yggB**/pVK9-Ec-dctA (đơn yêu cầu cấp patent này)

C. glutamicum 2256 Δ sucA Δ ldhA *yggB**/pVK9-Ec-dcuA (đơn yêu cầu cấp patent này)

C. glutamicum 2256 Δ sucA Δ ldhA *yggB**/pVK9-Ec-dcuB (đơn yêu cầu cấp patent này)

(2) Tạo ra các plasmid và các chủng

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng *C. glutamicum* 2256 (ATCC 13869) làm khuôn mẫu, và các đoạn mồi 1 và 2, để khuếch đại đoạn ADN chứa gen *dctA* của *C. glutamicum* (Cg-dctA). Đoạn ADN thu được và pVK9 (US2006-0141588) được cắt bằng *Bam*HI và *Pst*II được gắn bằng cách sử dụng bộ dụng cụ Clontech In-fusion HD Cloning Kit (TaKaRa Inc.), để tạo thành pVK9-Cg-dctA, là plasmid biểu hiện của Cg-dctA.

Theo cách giống như vậy, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng *E. coli* K-12 MG1655 (ATCC 47076) làm khuôn mẫu, kết hợp với các đoạn mồi 3 và 4 để khuếch đại đoạn ADN chứa gen *dctA* của *E. coli* (Ec-dctA), các đoạn mồi 5 và 6 để khuếch đại đoạn ADN chứa gen *dcuA* của *E. coli* (Ec-dcuA), và các đoạn mồi 7 và 8 để khuếch đại đoạn ADN chứa gen *dcuB* của *E. coli* (Ec-dcuB), và các đoạn ADN thu được được gắn với pVK9, để tạo ra pVK9-Ec-dctA, pVK9-Ec-dcuA, và pVK9-Ec-dcuB, là các plasmit biểu hiện của các gen đó.

Các plasmit được tạo ra được đưa vào trong chủng *C. glutamicum* 2256 Δ sucA Δ ldhA *yggB** (WO2014/185430), để tạo ra các chủng có mức biểu hiện được gia tăng của các gen mang hấp thu axit C4-dicarboxylic tương ứng. Chủng 2256 Δ sucA Δ ldhA *yggB** là chủng sản xuất axit glutamic thu được từ chủng *C. glutamicum* 2256 (ATCC 13869). Chủng 2256 Δ sucA Δ ldhA *yggB** khuyết các gen *ldhA* và *sucA*, và có sự đột biến IS (V419::IS) ở gen *yggB*. Trình tự nucleotit của gen *yggB* đột biến này (V419::IS) và trình tự axit amin của protein *YggB* đột biến (V419::IS) được mã hóa bởi gen được thể hiện trong các SEQ ID NO: 11 và 12.

(3) Quy trình nuôi cấy sản xuất axit glutamic

Quy trình nuôi cấy sản xuất axit glutamic được tiến hành bằng cách sử dụng từng chủng. Thành phần của môi trường được sử dụng được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: Thành phần môi trường

Glucoza	80 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	30 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g/L
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,01 g/L
VB ₁	200 µg/L
Biotin	300 µg/L
Mameno	0,48 g/L
CaCO ₃	50 g/L
Axit succinic	1 g/L

Môi trường có thành phần nêu trên được điều chỉnh đến độ pH=8,0 bằng KOH được điều chế, và thanh trùng bằng nồi hấp (115°C, 10 phút). Môi trường được thanh trùng được bổ sung CaCO₃ được thanh trùng bằng cách gia nhiệt khô (180°C, 6 giờ) ở nồng độ cuối 50 g/L, và được sử dụng để nuôi cấy.

Mỗi chủng được cấy vào trong 5mL môi trường chứa 50g/L CaCO₃ được chứa trong ống nghiệm lớn, và được nuôi cấy ở 31,5°C có rung với tốc độ 120 vòng/phút bằng cách sử dụng máy rung kiểu hộp (ABLE ML-190). Ở thời điểm 18 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, dịch nuôi cấy được lấy mẫu. Các nồng độ của axit glutamic và axit aspartic trong dịch nuôi cấy được định lượng bằng cách sử dụng lần lượt thiết bị phân tích Biotech-analyzer AS-310 (SAKURA SI) và thiết bị phân tích axit amin L-8800A (HITACHI).

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 1. Mức tích lũy axit glutamic (Glu) được cải thiện nhờ mức biểu hiện được gia tăng của Cg-dctA, Ec-dctA, Ec-dcuA, hoặc Ec-dcuB. Ngoài ra, sự tạo ra sản phẩm phụ axit aspartic được giảm nhờ sự gia tăng mức biểu hiện của Cg-dctA, Ec-dctA, Ec-dcuA, hoặc Ec-dcuB.

Như được nêu ở trên, mặc dù đã có báo cáo rằng phương pháp sản xuất axit L-amin sử dụng coryneform vi khuẩn có mức biểu hiện được gia tăng của gen *dctA* và axit L-glutamic được lấy làm ví dụ cho axit L-amin, nhưng lại không cho biết axit L-glutamic có thể được sản xuất bằng cách sử dụng vi khuẩn này hay không (tài liệu sáng chế 3). Hơn nữa, xét trên thực tế là protein được mã hóa bởi gen *dctA* có khả năng hấp thu đối với axit L-glutamic (tài liệu phi sáng chế 4), người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dự đoán rằng mức biểu hiện được gia tăng của gen *dctA* kích thích sự hấp thu axit L-glutamic vào trong tế bào, và bởi vậy lượng tích tụ axit L-glutamic trong môi trường bị giảm. Nghĩa là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này không thể dự đoán rằng mức sản xuất axit L-glutamic được cải thiện bởi sự gia tăng mức biểu hiện của gen *dctA*, và vì vậy, tài liệu sáng chế 3 về cơ bản không bộc lộ phương pháp sản xuất axit L-glutamic bằng cách sử dụng vi khuẩn coryneform có mức biểu hiện được gia tăng của gen *dctA*. Ngoài ra, cũng với lý do giống như vậy, khó mà tăng cường mức biểu hiện của gen *dctA* để sản xuất axit L-glutamic.

Hơn nữa, trong khi protein được mã hóa bởi gen *dctA* có khả năng hấp

thu đổi với axit L-glutamic (tài liệu phi sáng chế 4), protein được mã hóa bởi gen *yggB* có khả năng tiết axit L-glutamic (tài liệu phi sáng chế 5). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này không thể suy đoán được rằng việc sử dụng kết hợp gen *dctA* và gen *yggB*, mà hai gen này có chức năng trái ngược nhau, lại hữu ích cho quy trình sản xuất axit L-glutamic, và vì vậy, cũng khó mà kết hợp sử dụng gen *dctA* và gen *yggB* đột biến để sản xuất axit L-glutamic.

Giải thích về danh mục trình tự

Các SEQ ID NO:

1-8: Các đoạn môi

9: Trình tự nucleotit của gen *yggB* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

10: Trình tự axit amin của protein *YggB* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

11: Trình tự nucleotit của gen *yggB* đột biến (V419::IS) của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

12: Trình tự axit amin của protein được mã hóa bởi gen *yggB* đột biến (V419::IS) của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

13: Trình tự nucleotit của gen *xfp* của *Bifidobacterium longum* JCM1217

14: Trình tự axit amin của protein *Xfp* của *Bifidobacterium longum* JCM1217

15: Trình tự nucleotit của gen *dctA* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

16: Trình tự axit amin của protein *DctA* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

17: Trình tự nucleotit của gen *dctA* của *Escherichia coli* K-12 MG1655

18: Trình tự axit amin của protein *DctA* của *Escherichia coli* K-12 MG1655

19: Trình tự nucleotit của gen *dcuA* của *Escherichia coli* K-12 MG1655

20: Trình tự axit amin của protein *DcuA* của *Escherichia coli* K-12 MG1655

21: Trình tự nucleotit của gen *dcuB* của *Escherichia coli* K-12 MG1655

22: Trình tự axit amin của protein *DcuB* của *Escherichia coli* K-12 MG1655

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất axit L-amin, phương pháp này bao gồm bước:

A) nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sản sinh axit L-amin trong môi trường dẫn đến sự tích tụ axit L-amin trong môi trường này; và

B) thu gom axit L-amin từ môi trường;

trong đó vi khuẩn đã được cải biến sao cho hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng so với vi khuẩn không được cải biến,

trong đó vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic là protein được mã hóa bởi gen được chọn từ nhóm bao gồm gen *dctA*, gen *dcuA*, gen *dcuB* và các dạng tổ hợp của chúng, và

trong đó axit L-amin là axit L-amin khác với axit L-aspartic,

với điều kiện là axit L-amin là axit L-glutamic khi vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic là protein được mã hóa bởi gen *dctA*, và

với điều kiện là vi khuẩn đã được cải biến tiếp để mang gen *yggB* đột biến khi vi khuẩn là vi khuẩn coryneform và vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic là protein được mã hóa bởi gen *dctA*.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó gen *dctA* mã hóa protein được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 hoặc 18;

(b) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 hoặc 18, nhưng còn có cả sự thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, và/hoặc thêm đoạn của 1 đến 10 gốc axit amin, và trong đó protein này có hoạt tính hấp thu axit L-aspartic;

(c) protein bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 hoặc 18, và trong đó protein này có hoạt tính hấp thu axit aspartic.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó gen *dcuA* mã hóa protein được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20;

(b) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, nhưng còn có cả sự

thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, và/hoặc thêm đoạn của 1 đến 10 gốc axit amin, và trong đó protein này có hoạt tính hấp thu axit aspartic;

(c) protein bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, và trong đó protein này có hoạt tính hấp thu axit aspartic.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó gen *dcuB* mã hóa protein được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22;

(b) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22, nhưng còn có cả sự thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, và/hoặc thêm đoạn của 1 đến 10 gốc axit amin, và trong đó protein này có hoạt tính hấp thu axit aspartic;

(c) protein bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22, và trong đó protein này có hoạt tính hấp thu axit aspartic.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hoạt tính của vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic được gia tăng bằng cách gia tăng mức biểu hiện của gen mã hóa vật mang hấp thu axit C4-dicarboxylic.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó mức biểu hiện của gen được gia tăng bằng cách gia tăng số lượng bản sao của gen và/hoặc cải biến trình tự điều chỉnh mức biểu hiện của gen.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn đã được cải biến tiếp sao cho hoạt tính của phosphoketolaza được gia tăng so với vi khuẩn không được cải biến.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phosphoketolaza là D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và/hoặc fructoza-6-phosphat phosphoketolaza.

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó hoạt tính của phosphoketolaza được gia tăng bằng cách gia tăng mức biểu hiện của gen mã hóa phosphoketolaza.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn coryneform hoặc vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae*.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn thuộc giống

Corynebacterium.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó vi khuẩn là *Corynebacterium glutamicum*.

13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn thuộc giống *Pantoea* hoặc *Escherichia*.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó vi khuẩn là *Pantoea ananatis* hoặc *Escherichia coli*.

15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó axit L-amin là axit L-amin thuộc họ glutamat.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó axit L-amin của họ glutamat được chọn từ nhóm bao gồm axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-xitrulin, L-ornitin và hỗn hợp của chúng.

17. Phương pháp theo điểm 15, trong đó axit L-amin của họ glutamat là axit L-glutamic.

18. Phương pháp theo điểm 1, trong đó axit L-glutamic là monoamoni L-glutamat hoặc mononatri L-glutamat.

19. Phương pháp theo điểm 1,

trong đó axit L-amin là axit L-amin của họ glutamat, và

trong đó vi khuẩn đã được cải biến tiếp sao cho hoạt tính của α -ketoglutarat dehydrogenaza và/hoặc succinat dehydrogenaza bị giảm so với vi khuẩn không được cải biến.

20. Phương pháp theo điểm 1,

trong đó vi khuẩn là vi khuẩn coryneform, và

trong đó vi khuẩn đã được cải biến tiếp để mang gen *yggB* đột biến.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó gen *yggB* đột biến có sự đột biến mà truyền khả năng sản sinh axit L-glutamic được cải thiện cho vi khuẩn coryneform.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó gen *yggB* đột biến có sự đột biến được chọn từ nhóm bao gồm:

(1) sự đột biến ở vùng mã hóa cho các gốc axit amin ở các vị trí 419 đến 533 của SEQ ID NO: 10,

(2) sự đột biến ở vùng mã hóa cho vùng chuyển màng của SEQ ID NO: 10, và

(3) sự kết hợp của chúng.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó gen YggB kiểu đại mã hóa protein YggB mà được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10;

(b) protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, nhưng còn có cả sự thể đoạn, khuyết đoạn, xen đoạn, và/hoặc thêm đoạn của 1 đến 10 gốc axit amin, và trong đó protein này, khi biểu hiện quá mức trong vi khuẩn coryneform, thì truyền khả năng sản sinh axit L-glutamic được cải thiện cho vi khuẩn coryneform;

(c) protein bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 90% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, và trong đó protein này, khi biểu hiện quá mức trong vi khuẩn coryneform, thì truyền khả năng sản sinh axit L-glutamic được cải thiện cho vi khuẩn coryneform.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Phương pháp sản xuất axit L-amin

<130> D935-17308

<150> JP2016-195818

<151> 2016-10-03

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mở

<400> 1

ccaagcttgc atgccaggag gattataatg gattcaaaca cagaatcttc

50

<210> 2

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mở

<400> 2

cggtagccgg ggatcctagt ggtcttcttc taactccac

39

<210> 3

<211> 52

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mở

<400> 3

ccaagcttgc atgccaggag gattataatg aaaacctctc tgtttaaaag cc

52

<210> 4

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 4

cggtacccgg ggatcttaag aggataattc gtgcg

35

<210> 5

<211> 52

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 5

ccaagcttgc atgccaggag gattataatg ctagttgtag aactcatcat ag

52

<210> 6

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 6

cggtacccgg ggatcttaca gcatgaagct acccagcacg

40

<210> 7

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 7

ccaagcttgc atgccaggag gattataatg ttatttacta tccaacttat c

51

<210> 8

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 8

cggtacccgg ggatcttata agaaccgta catcgcggcg

40

<210> 9
 <211> 1602
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 9
 atgatttttag gcgtacccat tcaatatttg ctctattcat tgtggaattg gattgtcgat 60
 accggttttg atgtagcaat tatcctgggc ttggcgtttt tgattccacg tatcggccga 120
 ctggccatgc gtattatcaa gcagcgagtg gagtctgcag ccgatgcgga caccactaag 180
 aaccagctcg cgttcgctgg cgttggcggt tatatcgcg aaattgtggc gtttttcattg 240
 cttgccgtct ccgcgatgca ggcttttggg ttctctctcg cgggcgctgc gattccggca 300
 accattgcgt cagctgccat tggctcttgg gcgcagtcga ttgttgcgga cttcttggcc 360
 ggatttttca tcctgacgga aaagcaattc ggcggtgggtg actgggtgcg ctttgagggc 420
 aacggcatcg ttgttgaagg caccgtcatt gagatcacca tgcgcgcgac caaaattcgc 480
 acgattgcac aagagaccgt gatcatcccg aactccacgg cgaaagtgtg catcaacaat 540
 tctaataact ggtcgcgtgc ggttgtcgtt attccgatcc ccatgttggg ttctgaaaac 600
 atcacagatg tcatcgcgcg ctctgaagct gcgactcgtc gcgcacttgg ccaggagaaa 660
 atcgaccggg aaatcctcgg tgaactcgat gtgcaccag ccacggaagt cacaccgcca 720
 acggtggctg gcatgccgtg gatggtcacc atgcgtttcc tcgtgcaagt caccgccggc 780
 aatcaatggc tggtcgaacg cgccatccgc acagaaatca tcaacgaatt ctgggaagaa 840
 tacggcagcg caaccactac atcggggaacc ctcatgtatt ccttacacgt tgagcatgaa 900
 gagccaaaaga cctcgcttat cgacgcctcc ccccagggtc ttaaggaacc gaagccggag 960
 gctgcggcga cggttgcatc gctagctgca tcgtctaacg acgatgcaga caatgcagac 1020
 gcctcggcga tcaatgcagg caatccagag aaggaacttg attccgatgt gctggaacaa 1080
 gaactctcca gcgaagaacc ggaagaaaca gaaaaccag atcactctct ccgaggcttc 1140
 ttccgcactg attactacc aaatcggtgg cagaagatcc tgtcgtttgg cggacgtgtc 1200
 cgcatgagca cttccctgtt gttgggtgcg ctgctcttgc tgtcactatt taaggctcatg 1260
 actgtggaac caagtgagaa ttggcaaaac tccagtggat ggctgtcacc aagcactgcc 1320
 acctcaactg cggtgaccac ctccgaaact tccgcgccag caagcacgcc ttcgatgaca 1380
 gtgcccacta cggtggagga gacccaacg atggaatcta gcgtcgaaac gcagcaggaa 1440
 acctcaaccc ctgcaaccgc aacgccccag cgagccgaca ccacgaacc gaccgaggaa 1500
 gccacgtcgc aggaggaaaac gactgcatcg cagacgcagt ctccagcagt ggaagcacca 1560
 accgcggtcc aagaaacagt tgcgccgacg tccaccctt ag 1602

<210> 10
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 10
 Met Ile Leu Gly Val Pro Ile Gln Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu Trp Asn
 1 5 10 15
 Trp Ile Val Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala
 20 25 30
 Phe Leu Ile Pro Arg Ile Gly Arg Leu Ala Met Arg Ile Ile Lys Gln
 35 40 45
 Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr Thr Lys Asn Gln Leu Ala
 50 55 60
 Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln Ile Val Ala Phe Phe Met
 65 70 75 80
 Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly Phe Ser Leu Ala Gly Ala
 85 90 95
 Ala Ile Pro Ala Thr Ile Ala Ser Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Gln

				100				105					110		
Ser	Ile	Val	Ala	Asp	Phe	Leu	Ala	Gly	Phe	Phe	Ile	Leu	Thr	Glu	Lys
		115					120					125			
Gln	Phe	Gly	Val	Gly	Asp	Trp	Val	Arg	Phe	Glu	Gly	Asn	Gly	Ile	Val
		130				135					140				
Val	Glu	Gly	Thr	Val	Ile	Glu	Ile	Thr	Met	Arg	Ala	Thr	Lys	Ile	Arg
145					150				155						160
Thr	Ile	Ala	Gln	Glu	Thr	Val	Ile	Ile	Pro	Asn	Ser	Thr	Ala	Lys	Val
				165					170					175	
Cys	Ile	Asn	Asn	Ser	Asn	Asn	Trp	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Val	Ile	Pro
			180					185				190			
Ile	Pro	Met	Leu	Gly	Ser	Glu	Asn	Ile	Thr	Asp	Val	Ile	Ala	Arg	Ser
		195					200					205			
Glu	Ala	Ala	Thr	Arg	Arg	Ala	Leu	Gly	Gln	Glu	Lys	Ile	Ala	Pro	Glu
		210				215					220				
Ile	Leu	Gly	Glu	Leu	Asp	Val	His	Pro	Ala	Thr	Glu	Val	Thr	Pro	Pro
225					230				235						240
Thr	Val	Val	Gly	Met	Pro	Trp	Met	Val	Thr	Met	Arg	Phe	Leu	Val	Gln
				245				250						255	
Val	Thr	Ala	Gly	Asn	Gln	Trp	Leu	Val	Glu	Arg	Ala	Ile	Arg	Thr	Glu
			260					265					270		
Ile	Ile	Asn	Glu	Phe	Trp	Glu	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ala	Thr	Thr	Thr	Ser
		275					280					285			
Gly	Thr	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	His	Val	Glu	His	Glu	Glu	Pro	Lys	Thr
		290				295					300				
Ser	Leu	Ile	Asp	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Leu	Lys	Glu	Pro	Lys	Pro	Glu
305					310				315						320
Ala	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	Ser	Asn	Asp	Asp	Ala
				325				330						335	
Asp	Asn	Ala	Asp	Ala	Ser	Ala	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Pro	Glu	Lys	Glu
			340					345					350		
Leu	Asp	Ser	Asp	Val	Leu	Glu	Gln	Glu	Leu	Ser	Ser	Glu	Glu	Pro	Glu
		355					360					365			
Glu	Thr	Ala	Lys	Pro	Asp	His	Ser	Leu	Arg	Gly	Phe	Phe	Arg	Thr	Asp
		370				375					380				
Tyr	Tyr	Pro	Asn	Arg	Trp	Gln	Lys	Ile	Leu	Ser	Phe	Gly	Gly	Arg	Val
385					390				395						400
Arg	Met	Ser	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu
				405				410						415	
Phe	Lys	Val	Met	Thr	Val	Glu	Pro	Ser	Glu	Asn	Trp	Gln	Asn	Ser	Ser
			420					425					430		
Gly	Trp	Leu	Ser	Pro	Ser	Thr	Ala	Thr	Ser	Thr	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
		435					440					445			
Glu	Thr	Ser	Ala	Pro	Ala	Ser	Thr	Pro	Ser	Met	Thr	Val	Pro	Thr	Thr
		450													

<210> 11
 <211> 3063
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1269)

<400> 11
 atg att tta ggc gta ccc att caa tat ttg ctc tat tca ttg tgg aat 48
 Met Ile Leu Gly Val Pro Ile Gln Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu Trp Asn
 1 5 10 15
 tgg att gtc gat acc ggt ttt gat gta gca att atc ctg gtc ttg gcg 96
 Trp Ile Val Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala
 20 25 30
 ttt ttg att cca cgt atc ggc cga ctg gcc atg cgt att atc aag cag 144
 Phe Leu Ile Pro Arg Ile Gly Arg Leu Ala Met Arg Ile Ile Lys Gln
 35 40 45
 cga gtg gag tct gca gcc gat gcg gac acc act aag aac cag ctc gcg 192
 Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr Thr Lys Asn Gln Leu Ala
 50 55 60
 ttc gct ggc gtt ggc gtt tat atc gcg caa att gtg gcg ttt ttc atg 240
 Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln Ile Val Ala Phe Phe Met
 65 70 75 80
 ctt gcc gtc tcc gcg atg cag gct ttt ggt ttc tct ctc gcg ggc gct 288
 Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly Phe Ser Leu Ala Gly Ala
 85 90 95
 gcg att ccg gca acc att gcg tca gct gcc att ggt ctt ggt gcg cag 336
 Ala Ile Pro Ala Thr Ile Ala Ser Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Gln
 100 105 110
 tcg att gtt gcg gac ttc ttg gcc gga ttt ttc atc ctg acg gaa aag 384
 Ser Ile Val Ala Asp Phe Leu Ala Gly Phe Phe Ile Leu Thr Glu Lys
 115 120 125
 caa ttc ggc gtg ggt gac tgg gtg cgc ttt gag ggc aac ggc atc gtt 432
 Gln Phe Gly Val Gly Asp Trp Val Arg Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val
 130 135 140
 gtt gaa ggc acc gtc att gag atc acc atg cgc gcg acc aaa att cgc 480
 Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met Arg Ala Thr Lys Ile Arg
 145 150 155 160
 acg att gca caa gag acc gtg atc atc ccg aac tcc acg gcg aaa gtg 528
 Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro Asn Ser Thr Ala Lys Val
 165 170 175
 tgc atc aac aat tct aat aac tgg tcg cgt gcg gtt gtc gtt att ccg 576
 Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg Ala Val Val Val Ile Pro
 180 185 190
 atc ccc atg ttg ggt tct gaa aac atc aca gat gtc atc gcg cgc tct 624
 Ile Pro Met Leu Gly Ser Glu Asn Ile Thr Asp Val Ile Ala Arg Ser
 195 200 205
 gaa gct gcg act cgt cgc gca ctt ggc cag gag aaa atc gca ccg gaa 672
 Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln Glu Lys Ile Ala Pro Glu
 210 215 220

atc ctc ggt gaa ctc gat gtg cac cca gcc acg gaa gtc aca ccg cca	720
Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala Thr Glu Val Thr Pro Pro	
225 230 235 240	
acg gtg gtc ggc atg ccg tgg atg gtc acc atg cgt ttc ctc gtg caa	768
Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr Met Arg Phe Leu Val Gln	
245 250 255	
gtc acc gcc ggc aat caa tgg ctg gtc gaa cgc gcc atc cgc aca gaa	816
Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu Arg Ala Ile Arg Thr Glu	
260 265 270	
atc atc aac gaa ttc tgg gaa gaa tac ggc agc gca acc act aca tcg	864
Ile Ile Asn Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Ser	
275 280 285	
gga acc ctc att gat tcc tta cac gtt gag cat gaa gag cca aag acc	912
Gly Thr Leu Ile Asp Ser Leu His Val Glu His Glu Glu Pro Lys Thr	
290 295 300	
tcg ctt atc gac gcc tcc ccc cag gct ctt aag gaa ccg aag ccg gag	960
Ser Leu Ile Asp Ala Ser Pro Gln Ala Leu Lys Glu Pro Lys Pro Glu	
305 310 315 320	
gct gcg gcg acg gtt gca tcg cta gct gca tcg tct aac gac gat gca	1008
Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Leu Ala Ala Ser Ser Asn Asp Asp Ala	
325 330 335	
gac aat gca gac gcc tcg gcg atc aat gca ggc aat cca gag aag gaa	1056
Asp Asn Ala Asp Ala Ser Ala Ile Asn Ala Gly Asn Pro Glu Lys Glu	
340 345 350	
ctt gat tcc gat gtg ctg gaa caa gaa ctc tcc agc gaa gaa ccg gaa	1104
Leu Asp Ser Asp Val Leu Glu Gln Glu Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu	
355 360 365	
gaa aca gca aaa cca gat cac tct ctc cga ggc ttc ttc cgc act gat	1152
Glu Thr Ala Lys Pro Asp His Ser Leu Arg Gly Phe Phe Arg Thr Asp	
370 375 380	
tac tac cca aat cgg tgg cag aag atc ctg tcg ttt ggc gga cgt gtc	1200
Tyr Tyr Pro Asn Arg Trp Gln Lys Ile Leu Ser Phe Gly Gly Arg Val	
385 390 395 400	
cgc atg agc act tcc ctg ttg ttg ggt gcg ctg ctc ttg ctg tca cta	1248
Arg Met Ser Thr Ser Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu	
405 410 415	
ttt aag ggg ctc ttc ctg ttt tagagtgc at tgatcttatg gaccaactgc	1299
Phe Lys Gly Leu Phe Leu Phe	
420	
cctgaatgga taaggcaccg cagaatgtag tggttcaa at tacgga aacc tagagcaatc	1359
ccacgcaaat gctccaaccg tccgttgatc gcttcgaccg gaccgttgga gacaccaaca	1419
tcgaaatcgc ccaacacatc accaagtcgt ttaaaca aac tacgacccaa ctgcgcgagt	1479
tccttattcg gccccttcaa caccgaagc tgatcaataa tgggtccgcat tttcttcttc	1539
gcttcacgct tattacccat ctgataacaa tcaataatcg cctgatacgc aagccacgca	1599
agctttaaca ccccgtagtc tttgtc atac gccacaact gctccaagct ttcttgctga	1659
cgaggactca accacttggt cgtgggtcaac aaggtcttcc gggttttata caacggatcc	1719
tggcttaaac cagcagctg gtattttctc cgctggaggc gttgccggca ggcgggtgagc	1779
ttgtcaccag caagccgcac aacatggaat ggatccatca cgcgacgagc agaaggaatg	1839
agttctttac ttgctgtggc gtagccttg aacccatcca tggacacgat ccgtatctga	1899
ttgcggaact gttcaccgcg ggaaccaagc caggaccgta aagcatcagc actacgacct	1959
gggacgacat ctaataaccg ggcaggacac cgtgagtc at accgatgcc ggcatatcgc	2019
acaatcacgg tgacaaaccc atcaccatgc ttagccctat tatgtgacca cttatgctca	2079
tccaccccaa tgacatacac tccatcaaga tgggtgaggat cgttatagac cagctcacgg	2139
cacatatcga gggctagttg gcagggttaa tcccacccta gcccaagtgc tttcgcgggt	2199
gcgtgaacac tcatccggtc aatagcaagg cgttgcaaaa tccagcgggt gaccgggtgg	2259

```

gtgacctttt taccgtggtc agcgcagctt agttctgctt ggaaatactt ttgcttacat 2319
gtcgggttgg tgcagcggta gcgaggtaga cggataaaca gtttgggtgg aaacccgacg 2379
atgggtaaat caatgagcat ccggtgggtg tgatgacgaa acaccccagg ttgggagcat 2439
tctgggcagg tggagggtata gtcgagtgcg tctgcttcga tcagggtgta atcacctgca 2499
tcggaagcgc cggatgatggg gagtcctagt tccgcagtgcc ggcagatggg gtcagcgatg 2559
atgttgccgg tagacttcat gggtagagcc ttttgttggg gtttgggttag cttagataacc 2619
taaaccttaa ccctgacaaa aggctcgttt attttcgggt ctacaccgct agcccagggtt 2679
ctgtgatgta ccccaaaacc ggaagggcca tttaagggtca tgactgtgga accaagtggag 2739
aattggcaaa actccagtggt atggctgtca ccaagcactg ccacctcaac tgcgggtgacc 2799
acctccgaaa cttccgcgcc agcaagcacg ccttcgatga cagtgtccac tacgggtggag 2859
gagaccccaa cgatggaatc tagcgtcgaa acgcagcagg aaacctcaac ccctgcaacc 2919
gcaacgcccc agcgagccga caccatcgaa ccgaccgagg aagccacgtc gcaggaggaa 2979
acgactgcat cgcagacgca gtctccagca gtggaagcac caaccgcggt ccaagaaaca 3039
gttgcgccga cgtccacccc ttag 3063

```

<210> 12
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 12
 Met Ile Leu Gly Val Pro Ile Gln Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu Trp Asn
 1 5 10 15
 Trp Ile Val Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala
 20 25 30
 Phe Leu Ile Pro Arg Ile Gly Arg Leu Ala Met Arg Ile Ile Lys Gln
 35 40 45
 Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr Thr Lys Asn Gln Leu Ala
 50 55 60
 Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln Ile Val Ala Phe Phe Met
 65 70 75 80
 Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly Phe Ser Leu Ala Gly Ala
 85 90 95
 Ala Ile Pro Ala Thr Ile Ala Ser Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Gln
 100 105 110
 Ser Ile Val Ala Asp Phe Leu Ala Gly Phe Phe Ile Leu Thr Glu Lys
 115 120 125
 Gln Phe Gly Val Gly Asp Trp Val Arg Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val
 130 135 140
 Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met Arg Ala Thr Lys Ile Arg
 145 150 155 160
 Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro Asn Ser Thr Ala Lys Val
 165 170 175
 Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg Ala Val Val Val Ile Pro
 180 185 190
 Ile Pro Met Leu Gly Ser Glu Asn Ile Thr Asp Val Ile Ala Arg Ser
 195 200 205
 Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln Glu Lys Ile Ala Pro Glu
 210 215 220
 Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala Thr Glu Val Thr Pro Pro
 225 230 235 240
 Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr Met Arg Phe Leu Val Gln
 245 250 255
 Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu Arg Ala Ile Arg Thr Glu

	260		265		270
Ile Ile Asn Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Ser					
	275		280		285
Gly Thr Leu Ile Asp Ser Leu His Val Glu His Glu Glu Pro Lys Thr					
	290		295		300
Ser Leu Ile Asp Ala Ser Pro Gln Ala Leu Lys Glu Pro Lys Pro Glu					
305		310		315	320
Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Leu Ala Ala Ser Ser Asn Asp Asp Ala					
	325		330		335
Asp Asn Ala Asp Ala Ser Ala Ile Asn Ala Gly Asn Pro Glu Lys Glu					
	340		345		350
Leu Asp Ser Asp Val Leu Glu Gln Glu Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu					
	355		360		365
Glu Thr Ala Lys Pro Asp His Ser Leu Arg Gly Phe Phe Arg Thr Asp					
	370		375		380
Tyr Tyr Pro Asn Arg Trp Gln Lys Ile Leu Ser Phe Gly Gly Arg Val					
385		390		395	400
Arg Met Ser Thr Ser Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu					
	405		410		415
Phe Lys Gly Leu Phe Leu Phe					
	420				

<210> 13
 <211> 2478
 <212> ADN
 <213> Bifidobacterium longum

<400> 13
 atgacgagtc ctgttattgg cacccttgg aagaagctca acgctccggt ttccgaggaa 60
 gccctcgaag gcgttgacaa gtactggcgc gttgccaaact acctttccat cggccagatt 120
 tatctgcgtt ccaacccgct gatgaaggag cccttcaccc gcgaagatgt gaagcaccgt 180
 ctggtggggc actggggcac tacccttggc ctgaacttcc tcatcggcca catcaaccgt 240
 ttcattgctg accacggcca gaacaccgtg atcatcatgg gcccgggcca cgggtggccc 300
 gccggtacct cccagtccta cctggacggc acctacaccg agaccttccc gaagatcacc 360
 aaggacgaag ctggtctgca gaagttcttc cgtcagttct cttacccggg cggcattccg 420
 tcccacttcg ctccggagac cccgggctcc atccacgagg gtggtgagct gggttacgct 480
 ctgtcccacg cttacggcgc catcatggac aaccgagcc tgtttgtccc ggccatcgtc 540
 ggcgacggcg aggtgagac cggcccgtg gctaccggct ggcagtcaa caagctcgtg 600
 aaccgcgcga cgcagcggat cgtgctgccg atcctgcacc tcaacggcta caagatcgcc 660
 aaccgacca tcctgtcccg catctccgac gaagagctcc acgagttctt ccacggcatg 720
 ggttacgagc cctacgagtt cgtcgctggc ttcgatgatg aggaccacat gtccatccac 780
 cgtcgcttcg ccgagctgtg ggagaccatc tgggacgaga tctgcgacat caaggccacc 840
 gtcagaccg acaacgtgca ccgtccgttc taccgatgc tgatcttccg caccgccgaag 900
 ggctggacct gccgaagta catcgacggc aagaagaccg agggctcctg gcgttcccac 960
 caggtgccgc tggcttccgc ccgcgacacc gaggccact tcgaggttct caagaactgg 1020
 ctcgagtcct acaagccgga agagctgttc gacgccaacg gtgctgtcaa ggacgacgtc 1080
 cttgccttca tgccgaaggg cgagctgcgt atcgggtgcca accggaacgc caacggtggt 1140
 gtgatccgca acgacctgaa gctgccgaac ctcgaggact acgaggtcaa ggaagtggct 1200
 gagtacggcc acggctgggg ccagctcgag gccacccgta ccctgggtgc ctacactcgc 1260
 gacatcatca agaacaaccc gcgcgacttc cgcattcttc gaccggatga gaccgcttcc 1320
 aaccgtctgc aggttctcta cgaagtcacc aacaagcagt gggatgccgg ctacatctcc 1380
 gacgaggtcg acgagcacat gcacgtctcc ggccaggtcg ttgagcagct gtccgagcac 1440
 cagatggaag gcttcctcga ggcttacctg ctgaccggtc gtcacggcat ctggagctcc 1500
 tacgagtcct tcgtccacgt gatcgactcc atgctgaacc agcacgcaa gtggcttgag 1560

```

gctaccgtcc gcgagattcc gtggcgcaag ccgattgcct ccatgaacct gctgggtctcc 1620
tcccacgttt ggcgtcagga ccacaacggc ttctcccacc aggatccggg tgtcacctcc 1680
gtcctgctga acaagtgtt ccacaacgac cacgtcatcg gcatctactt cgccaccgat 1740
gcgaacatgc tgctggccat cgccgagaag tgctacaagt ccaccaacaa gatcaacgcc 1800
atcatcgctg gtaagcagcc tgctgccacc tggctgaccc tggacgaggc tcgtgccgag 1860
ctcgagaagg gtgccgccgc ttgggattgg gcttccaccg ccaagaacaa cgatgaggcc 1920
gaggtcgtgc ttgccgccgc cggcgatgtc ccgactcagg agatcatggc tgcttccgac 1980
aagctgaagg aactgggcat caagttcaag gttgtgaacg ttgccgacct gctctccctg 2040
cagtccgcca aggagaacga cgaggctctg accgacgagg agttcgccga catcttcacc 2100
gccgacaagc cgggtgctgtt cgcgctaccac tcctacgctc acgacgtgcg tggcctgatc 2160
tacgaccgtc cgaaccacga caacttcaac gtccacggct acgaggagga gggctccacc 2220
accaccccgt acgacatggg tcgtgtcaac cgcacgacc gctacgagct gaccgctgag 2280
gctctgcgca tgatcgacgc cgacaagtac gccgacaaga tcgacgagct cgagaagttc 2340
cgtgatgagg ccttccagtt cgccgtcgac aacggctacg atcaccgga ctacaccgac 2400
tgggtgtact ccggcgtgaa caccgacaag aagggtgccg tcaccgctac cgccgctacc 2460
gctggcgaca acgagtga 2478

```

<210> 14
 <211> 825
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium longum

<400> 14
 Met Thr Ser Pro Val Ile Gly Thr Pro Trp Lys Lys Leu Asn Ala Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Glu Ala Leu Glu Gly Val Asp Lys Tyr Trp Arg Val Ala
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Ser Ile Gly Gln Ile Tyr Leu Arg Ser Asn Pro Leu Met
 35 40 45
 Lys Glu Pro Phe Thr Arg Glu Asp Val Lys His Arg Leu Val Gly His
 50 55 60
 Trp Gly Thr Thr Pro Gly Leu Asn Phe Leu Ile Gly His Ile Asn Arg
 65 70 75 80
 Phe Ile Ala Asp His Gly Gln Asn Thr Val Ile Ile Met Gly Pro Gly
 85 90 95
 His Gly Gly Pro Ala Gly Thr Ser Gln Ser Tyr Leu Asp Gly Thr Tyr
 100 105 110
 Thr Glu Thr Phe Pro Lys Ile Thr Lys Asp Glu Ala Gly Leu Gln Lys
 115 120 125
 Phe Phe Arg Gln Phe Ser Tyr Pro Gly Gly Ile Pro Ser His Phe Ala
 130 135 140
 Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly Glu Leu Gly Tyr Ala
 145 150 155 160
 Leu Ser His Ala Tyr Gly Ala Ile Met Asp Asn Pro Ser Leu Phe Val
 165 170 175
 Pro Ala Ile Val Gly Asp Gly Glu Ala Glu Thr Gly Pro Leu Ala Thr
 180 185 190
 Gly Trp Gln Ser Asn Lys Leu Val Asn Pro Arg Thr Asp Gly Ile Val
 195 200 205
 Leu Pro Ile Leu His Leu Asn Gly Tyr Lys Ile Ala Asn Pro Thr Ile
 210 215 220
 Leu Ser Arg Ile Ser Asp Glu Glu Leu His Glu Phe Phe His Gly Met
 225 230 235 240
 Gly Tyr Glu Pro Tyr Glu Phe Val Ala Gly Phe Asp Asp Glu Asp His

														245															250															255	
Met	Ser	Ile	His	Arg	Arg	Phe	Ala	Glu	Leu	Trp	Glu	Thr	Ile	Trp	Asp																														
														260															265															270	
Glu	Ile	Cys	Asp	Ile	Lys	Ala	Thr	Ala	Gln	Thr	Asp	Asn	Val	His	Arg																														
														275															280															285	
Pro	Phe	Tyr	Pro	Met	Leu	Ile	Phe	Arg	Thr	Pro	Lys	Gly	Trp	Thr	Cys																														
														290															295															300	
Pro	Lys	Tyr	Ile	Asp	Gly	Lys	Lys	Thr	Glu	Gly	Ser	Trp	Arg	Ser	His																														
305															310															315															320
Gln	Val	Pro	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	Asp	Thr	Glu	Ala	His	Phe	Glu	Val																														
														325															330															335	
Leu	Lys	Asn	Trp	Leu	Glu	Ser	Tyr	Lys	Pro	Glu	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala																														
														340															345															350	
Asn	Gly	Ala	Val	Lys	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Phe	Met	Pro	Lys	Gly	Glu																														
														355															360															365	
Leu	Arg	Ile	Gly	Ala	Asn	Pro	Asn	Ala	Asn	Gly	Gly	Val	Ile	Arg	Asn																														
														370															375															380	
Asp	Leu	Lys	Leu	Pro	Asn	Leu	Glu	Asp	Tyr	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala																														
385															390															395															400
Glu	Tyr	Gly	His	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Glu	Ala	Thr	Arg	Thr	Leu	Gly																														
														405															410															415	
Ala	Tyr	Thr	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Asn	Asn	Pro	Arg	Asp	Phe	Arg	Ile																														
														420															425															430	
Phe	Gly	Pro	Asp	Glu	Thr	Ala	Ser	Asn	Arg	Leu	Gln	Ala	Ser	Tyr	Glu																														
														435															440															445	
Val	Thr	Asn	Lys	Gln	Trp	Asp	Ala	Gly	Tyr	Ile	Ser	Asp	Glu	Val	Asp																														
														450															455															460	
Glu	His	Met	His	Val	Ser	Gly	Gln	Val	Val	Glu	Gln	Leu	Ser	Glu	His																														
465															470															475															480
Gln	Met	Glu	Gly	Phe	Leu	Glu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	His	Gly																														
														485															490															495	
Ile	Trp	Ser	Ser	Tyr	Glu	Ser	Phe	Val	His	Val	Ile	Asp	Ser	Met	Leu																														
														500															505															510	
Asn	Gln	His	Ala	Lys	Trp	Leu	Glu	Ala	Thr	Val	Arg	Glu	Ile	Pro	Trp																														
														515															520															525	
Arg	Lys	Pro	Ile	Ala	Ser	Met	Asn	Leu	Leu	Val	Ser	Ser	His	Val	Trp																														
														530															535															540	
Arg	Gln	Asp	His	Asn	Gly	Phe	Ser	His	Gln	Asp	Pro	Gly	Val	Thr	Ser																														
545															550															555															560
Val	Leu	Leu	Asn	Lys	Cys	Phe	His	Asn	Asp	His	Val	Ile	Gly	Ile	Tyr																														
														565															570															575	
Phe	Ala	Thr	Asp	Ala	Asn	Met	Leu	Leu	Ala	Ile	Ala	Glu	Lys	Cys	Tyr																														
														580															585															590	
Lys	Ser	Thr	Asn	Lys	Ile	Asn	Ala	Ile	Ile	Ala	Gly	Lys	Gln	Pro	Ala																														
														595															600															605	
Ala	Thr	Trp	Leu	Thr	Leu	Asp	Glu	Ala	Arg	Ala	Glu	Leu	Glu	Lys	Gly																														
														610															615															620	
Ala	Ala	Ala	Trp	Asp	Trp	Ala	Ser	Thr	Ala	Lys	Asn	Asn	Asp	Glu	Ala																														
625															630															635															640
Glu	Val	Val	Leu	Ala																																									

Ala Leu Thr Asp Glu Glu Phe Ala Asp Ile Phe Thr Ala Asp Lys Pro
690 695 700
Val Leu Phe Ala Tyr His Ser Tyr Ala His Asp Val Arg Gly Leu Ile
705 710 715 720
Tyr Asp Arg Pro Asn His Asp Asn Phe Asn Val His Gly Tyr Glu Glu
725 730 735
Glu Gly Ser Thr Thr Thr Pro Tyr Asp Met Val Arg Val Asn Arg Ile
740 745 750
Asp Arg Tyr Glu Leu Thr Ala Glu Ala Leu Arg Met Ile Asp Ala Asp
755 760 765
Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Asp Glu Leu Glu Lys Phe Arg Asp Glu Ala
770 775 780
Phe Gln Phe Ala Val Asp Asn Gly Tyr Asp His Pro Asp Tyr Thr Asp
785 790 795 800
Trp Val Tyr Ser Gly Val Asn Thr Asp Lys Lys Gly Ala Val Thr Ala
805 810 815
Thr Ala Ala Thr Ala Gly Asp Asn Glu
820 825

<210> 15
<211> 1341
<212> ADN
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 15
atggattcaa acacagaatc ttcaagtgtt gaggtcaaaa acgaacacat taaagttcaa 60
aagccgccga agaaggaccg cactcactgg ctctacattg cggtcattat cgcattgatt 120
ggcgggtatta ccctaggcct gatttcaccg gagttgggca aagaattcaa gattttgggc 180
accatgtttg tgtccttgat caagatgatt atcgctccag ttattttctg caccatcgtc 240
atcggaatcg gttcagtcaa ggcagcggca acagtcggac gcgctggtgg catcgccctt 300
gcgtacttca tcacgatgtc cacattcgca ctgcagttg gcctgctagt cggtaaattc 360
atccagccag gtagcggact gaacatctca gttgatgaag aatcttcatt cgcattccaca 420
gagagcagcc ctgaaggact cttgggattc atccactcga tcatccctga aacgttcttc 480
tctgcattta ctgatgggtc ggtgctgcag gtactgttca tcgccatcct cgtgggcttt 540
gcagctcagt cgatgggtga aaaggacag cccatccttg atttcgtatc ccatctgcag 600
aagctcatct tcaagatttt gaactggatt ctgtggctcg cccagtcgg tgcattcggt 660
gcaatggccg gcgtcgttgg cgaaacaggc tttgatgccg ttgttcagct cgggtattttg 720
atcctcgcct tttacgtcac ctgcgtgatc ttcattcttg gcgtgctggg cgccgtactg 780
aaggtgttca ccggcgtgaa tatcttcaag ctggtcaagt accttgcaa ggaattcctg 840
ctgatctttg ctacctcatc ctctgaatct gccttgccaa acctcatgcg caagatggaa 900
cacatcggtg tggctaaacc aaccgtcgga atcgtggtcc caaccggcta ttccttcaac 960
ttggacggca ccgcaattta cctcaccatg gcatctatct tcattgccga cgcgatgaat 1020
atgccgatga gcctcggcga gcaggtcggg ctgcttgtct tcatgatcat cgcattccaag 1080
ggcgtgctg gtgtctcggg tgccgggtatt gcaacgttgg ctgccggatt gtcttcacac 1140
cgcccagaac ttctgcacgg cgttgacgtg attgtgggca tcgataaatt catgtctgaa 1200
gcccgcgcac taaccaactt cgccggaaac tccgtggcaa cactgctggt cggcaagtgg 1260
actggcaccg tggacatgaa ccaagtccat gacgttttga atggaaaatc tccatttgtg 1320
gagttagaag aagaccacta g 1341

<210> 16
<211> 446
<212> PRT
<213> *Corynebacterium glutamicum*

```

<400> 16
Met Asp Ser Asn Thr Glu Ser Ser Ser Val Glu Val Lys Asn Glu His
1      5      10      15
Ile Lys Val Gln Lys Pro Pro Lys Lys Asp Arg Thr His Trp Leu Tyr
      20      25      30
Ile Ala Val Ile Ile Ala Leu Ile Gly Gly Ile Thr Leu Gly Leu Ile
      35      40      45
Ser Pro Glu Leu Gly Lys Glu Phe Lys Ile Leu Gly Thr Met Phe Val
      50      55      60
Ser Leu Ile Lys Met Ile Ile Ala Pro Val Ile Phe Cys Thr Ile Val
      65      70      75      80
Ile Gly Ile Gly Ser Val Lys Ala Ala Ala Thr Val Gly Arg Ala Gly
      85      90      95
Gly Ile Ala Leu Ala Tyr Phe Ile Thr Met Ser Thr Phe Ala Leu Ala
      100      105      110
Val Gly Leu Leu Val Gly Asn Phe Ile Gln Pro Gly Ser Gly Leu Asn
      115      120      125
Ile Ser Val Asp Glu Glu Ser Ser Phe Ala Ser Thr Glu Ser Ser Pro
      130      135      140
Glu Gly Leu Leu Gly Phe Ile His Ser Ile Ile Pro Glu Thr Phe Phe
      145      150      155      160
Ser Ala Phe Thr Asp Gly Ser Val Leu Gln Val Leu Phe Ile Ala Ile
      165      170      175
Leu Val Gly Phe Ala Ala Gln Ser Met Gly Glu Lys Gly Gln Pro Ile
      180      185      190
Leu Asp Phe Val Ser His Leu Gln Lys Leu Ile Phe Lys Ile Leu Asn
      195      200      205
Trp Ile Leu Trp Leu Ala Pro Val Gly Ala Phe Gly Ala Met Ala Gly
      210      215      220
Val Val Gly Glu Thr Gly Phe Asp Ala Val Val Gln Leu Gly Ile Leu
      225      230      235      240
Ile Leu Ala Phe Tyr Val Thr Cys Val Ile Phe Ile Phe Gly Val Leu
      245      250      255
Gly Ala Val Leu Lys Val Phe Thr Gly Val Asn Ile Phe Lys Leu Val
      260      265      270
Lys Tyr Leu Ala Lys Glu Phe Leu Leu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Ser
      275      280      285
Glu Ser Ala Leu Pro Asn Leu Met Arg Lys Met Glu His Ile Gly Val
      290      295      300
Ala Lys Pro Thr Val Gly Ile Val Val Pro Thr Gly Tyr Ser Phe Asn
      305      310      315      320
Leu Asp Gly Thr Ala Ile Tyr Leu Thr Met Ala Ser Ile Phe Ile Ala
      325      330      335
Asp Ala Met Asn Met Pro Met Ser Leu Gly Glu Gln Val Gly Leu Leu
      340      345      350
Val Phe Met Ile Ile Ala Ser Lys Gly Ala Ala Gly Val Ser Gly Ala
      355      360      365
Gly Ile Ala Thr Leu Ala Ala Gly Leu Ser Ser His Arg Pro Glu Leu
      370      375      380
Leu His Gly Val Asp Val Ile Val Gly Ile Asp Lys Phe Met Ser Glu
      385      390      395      400
Ala Arg Ala Leu Thr Asn Phe Ala Gly Asn Ser Val Ala Thr Leu Leu
      405      410      415
Val Gly Lys Trp Thr Gly Thr Val Asp Met Asn Gln Val His Asp Val

```

420 425 430
 Leu Asn Gly Lys Ser Pro Phe Val Glu Leu Glu Glu Asp His
 435 440 445

<210> 17
 <211> 1287
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 17
 atgaaaacct ctctgttttaa aagccttttac tttcagggtcc tgacagcgat agccattgggt 60
 attctccttg gccattttcta tcctgaaata ggcgagcaaa tgaaaccgct tggcgacggc 120
 ttcgttaagc tcattaagat gatcatcgct cctgtcatct tttgtaccgt cgtaacgggc 180
 attgcgggca tggaaagcat gaaggcggtc ggtcgtaccg gcgcagtcgc actgctttac 240
 tttgaaattg tcagtaccat cgcgctgatt attggtccta tcatcgtaa cgtcgtgcag 300
 cctgggtgccg gaatgaacgt cgatccggca acgcttgatg cgaaagcggg agcgggtttac 360
 gccgatcagg cgaaagacca gggcattgtc gccttcatta tggatgtcat cccggcgagc 420
 gtcattggcg catttgccag cggtaacatt ctgcagggtc tgctgtttgc cgtactgttt 480
 ggttttgcgc tccaccgtct gggcagcaaa ggccaactga tttttaacgt catcgaaagt 540
 ttctcgcagg tcatcttcgg catcatcaat atgatcatgc gtctggcacc tattggtgcg 600
 ttcggggcaa tggcgttttac catcggtaaa tacggcgctc gcacactggg gcaactgggg 660
 cagctgatta tctgtttcta cattacctgt atcctgtttg tgggtgctgg attgggttca 720
 atcgctaaag cgactggttt cagtatcttc aaatttatcc gctacatccg tgaagaactg 780
 ctgattgtac tggggacttc atcttccgag tcggcgctgc cgcgtatgct cgacaagatg 840
 gagaaactcg gctgccgtaa atcgggtggg gggctgggtc tcccgacagg ctactcgttt 900
 aaccttgatg gcacatcgat atacctgaca atggcggcgg tgtttatcgc ccaggccact 960
 aacagtcaga tggatatcgt ccaccaaact acgctgttaa tcgtgttgct gctttcttct 1020
 aaagggcgcg caggggtaac gggtagtggc tttatcgtgc tggcggcgac gctctctgcg 1080
 gtgggccatt tgccggtagc gggctctggc ctgatcctc gtatcgaccg ctttatgtca 1140
 gaagctcgtg cgctgactaa cctggtcggt aacggcgtag cgaccattgt cgttgctaag 1200
 tgggtgaaag aactggacca caaaaaactg gacgatgtgc tgaataatcg tgcgccggat 1260
 ggcaaaacgc acgaattatc ctcttaa 1287

<210> 18
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 18
 Met Lys Thr Ser Leu Phe Lys Ser Leu Tyr Phe Gln Val Leu Thr Ala
 1 5 10 15
 Ile Ala Ile Gly Ile Leu Leu Gly His Phe Tyr Pro Glu Ile Gly Glu
 20 25 30
 Gln Met Lys Pro Leu Gly Asp Gly Phe Val Lys Leu Ile Lys Met Ile
 35 40 45
 Ile Ala Pro Val Ile Phe Cys Thr Val Val Thr Gly Ile Ala Gly Met
 50 55 60
 Glu Ser Met Lys Ala Val Gly Arg Thr Gly Ala Val Ala Leu Leu Tyr
 65 70 75 80
 Phe Glu Ile Val Ser Thr Ile Ala Leu Ile Ile Gly Leu Ile Ile Val
 85 90 95
 Asn Val Val Gln Pro Gly Ala Gly Met Asn Val Asp Pro Ala Thr Leu
 100 105 110

Asp Ala Lys Ala Val Ala Val Tyr Ala Asp Gln Ala Lys Asp Gln Gly
 115 120 125
 Ile Val Ala Phe Ile Met Asp Val Ile Pro Ala Ser Val Ile Gly Ala
 130 135 140
 Phe Ala Ser Gly Asn Ile Leu Gln Val Leu Leu Phe Ala Val Leu Phe
 145 150 155 160
 Gly Phe Ala Leu His Arg Leu Gly Ser Lys Gly Gln Leu Ile Phe Asn
 165 170 175
 Val Ile Glu Ser Phe Ser Gln Val Ile Phe Gly Ile Ile Asn Met Ile
 180 185 190
 Met Arg Leu Ala Pro Ile Gly Ala Phe Gly Ala Met Ala Phe Thr Ile
 195 200 205
 Gly Lys Tyr Gly Val Gly Thr Leu Val Gln Leu Gly Gln Leu Ile Ile
 210 215 220
 Cys Phe Tyr Ile Thr Cys Ile Leu Phe Val Val Leu Val Leu Gly Ser
 225 230 235 240
 Ile Ala Lys Ala Thr Gly Phe Ser Ile Phe Lys Phe Ile Arg Tyr Ile
 245 250 255
 Arg Glu Glu Leu Leu Ile Val Leu Gly Thr Ser Ser Ser Glu Ser Ala
 260 265 270
 Leu Pro Arg Met Leu Asp Lys Met Glu Lys Leu Gly Cys Arg Lys Ser
 275 280 285
 Val Val Gly Leu Val Ile Pro Thr Gly Tyr Ser Phe Asn Leu Asp Gly
 290 295 300
 Thr Ser Ile Tyr Leu Thr Met Ala Ala Val Phe Ile Ala Gln Ala Thr
 305 310 315 320
 Asn Ser Gln Met Asp Ile Val His Gln Ile Thr Leu Leu Ile Val Leu
 325 330 335
 Leu Leu Ser Ser Lys Gly Ala Ala Gly Val Thr Gly Ser Gly Phe Ile
 340 345 350
 Val Leu Ala Ala Thr Leu Ser Ala Val Gly His Leu Pro Val Ala Gly
 355 360 365
 Leu Ala Leu Ile Leu Gly Ile Asp Arg Phe Met Ser Glu Ala Arg Ala
 370 375 380
 Leu Thr Asn Leu Val Gly Asn Gly Val Ala Thr Ile Val Val Ala Lys
 385 390 395 400
 Trp Val Lys Glu Leu Asp His Lys Lys Leu Asp Asp Val Leu Asn Asn
 405 410 415
 Arg Ala Pro Asp Gly Lys Thr His Glu Leu Ser Ser
 420 425

<210> 19
 <211> 1302
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 19
 atgctagttg tagaactcat catagttttg ctggcgatct tcttgggcgc cagattgggg 60
 ggaataggta ttggttttgc aggcggattg ggggtgctgg ttcttgccgc tattggcggt 120
 aaaccggta acatcccggt cgatgtcatc tccattatca tggcggttat cgccgctatt 180
 tctgccatgc aggttgctgg cggctcggac tatctgggtc atcagacaga aaagctgctg 240
 cgccgtaacc cgaaatacat cagatcctc gcaccgatcg tgacctattt cctgactatc 300
 tttgctggta ctggcaacat ctctctggcg aactgccag ttatcgctga agttgcgaag 360
 gaacaaggcg ttaaacttg ccgtccgctg tctactgcag tggatatccgc gcagattgcg 420

```

atcaccgcat cgccaatctc agcggcagtg gtttacatgt cttccgtgat ggaagggtcat 480
ggcatcagct acctccatct gctctccgtg gtcatcccgt ccaccctgct ggcggttctg 540
gtgatgtcct tcctggtcac tatgctgttc aactccaaac tctctgacga tccgatttat 600
cgcaagcgtc tggaagaggg cctgggtgaa ctgcgcggtg aaaagcagat tgaaatcaaa 660
tccggtgcaa aaacgtccgt ctggctgttc ctgctgggcg tagttggcgt ggttatctat 720
gcaatcatca acagcccaag catgggtctg gttgaaaaac cgctgatgaa caccaccaac 780
gcaatcctga tcatcatgct cagcgttgca actctgacca ccgttatctg taaagtcgat 840
accgacaaca tcctcaactc cagcaccttc aaagcaggta tgagcgcctg tatttgatc 900
ctgggtgttg cgtggctggg cgatactttc gtttccaaca acatcgactg gatcaaagat 960
accgctggtg aagtgattca gggatcatccg tggctgctgg ccgtcatctt cttctttgct 1020
tctgctctgc tgtactctca ggctgcaacc gcaaaagcac tgatgccgat ggctctggca 1080
ctgaacgttt caccgctgac cgctgttgct tctttcgctg cgggtgtctgg tctgttcatt 1140
ctgccgacct acccgacgct gggtgctgcg gtacagatgg atgacacggg tactaccgct 1200
atcggtaaat tcgtcttcaa ccatccgttc ttcatcccgg gtactctggg tgttgccctg 1260
gccgtttgct tcggcttcgt gctgggtagc ttcatgctgt aa 1302

```

<210> 20
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 20
 Met Leu Val Val Glu Leu Ile Ile Val Leu Leu Ala Ile Phe Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Arg Leu Gly Gly Ile Gly Ile Gly Phe Ala Gly Gly Leu Gly Val
 20 25 30
 Leu Val Leu Ala Ala Ile Gly Val Lys Pro Gly Asn Ile Pro Phe Asp
 35 40 45
 Val Ile Ser Ile Ile Met Ala Val Ile Ala Ala Ile Ser Ala Met Gln
 50 55 60
 Val Ala Gly Gly Leu Asp Tyr Leu Val His Gln Thr Glu Lys Leu Leu
 65 70 75 80
 Arg Arg Asn Pro Lys Tyr Ile Thr Ile Leu Ala Pro Ile Val Thr Tyr
 85 90 95
 Phe Leu Thr Ile Phe Ala Gly Thr Gly Asn Ile Ser Leu Ala Thr Leu
 100 105 110
 Pro Val Ile Ala Glu Val Ala Lys Glu Gln Gly Val Lys Pro Cys Arg
 115 120 125
 Pro Leu Ser Thr Ala Val Val Ser Ala Gln Ile Ala Ile Thr Ala Ser
 130 135 140
 Pro Ile Ser Ala Ala Val Val Tyr Met Ser Ser Val Met Glu Gly His
 145 150 155 160
 Gly Ile Ser Tyr Leu His Leu Leu Ser Val Val Ile Pro Ser Thr Leu
 165 170 175
 Leu Ala Val Leu Val Met Ser Phe Leu Val Thr Met Leu Phe Asn Ser
 180 185 190
 Lys Leu Ser Asp Asp Pro Ile Tyr Arg Lys Arg Leu Glu Glu Gly Leu
 195 200 205
 Val Glu Leu Arg Gly Glu Lys Gln Ile Glu Ile Lys Ser Gly Ala Lys
 210 215 220
 Thr Ser Val Trp Leu Phe Leu Leu Gly Val Val Gly Val Val Ile Tyr
 225 230 235 240
 Ala Ile Ile Asn Ser Pro Ser Met Gly Leu Val Glu Lys Pro Leu Met
 245 250 255

Asn Thr Thr Asn Ala Ile Leu Ile Ile Met Leu Ser Val Ala Thr Leu
 260 265 270
 Thr Thr Val Ile Cys Lys Val Asp Thr Asp Asn Ile Leu Asn Ser Ser
 275 280 285
 Thr Phe Lys Ala Gly Met Ser Ala Cys Ile Cys Ile Leu Gly Val Ala
 290 295 300
 Trp Leu Gly Asp Thr Phe Val Ser Asn Asn Ile Asp Trp Ile Lys Asp
 305 310 315 320
 Thr Ala Gly Glu Val Ile Gln Gly His Pro Trp Leu Leu Ala Val Ile
 325 330 335
 Phe Phe Phe Ala Ser Ala Leu Leu Tyr Ser Gln Ala Ala Thr Ala Lys
 340 345 350
 Ala Leu Met Pro Met Ala Leu Ala Leu Asn Val Ser Pro Leu Thr Ala
 355 360 365
 Val Ala Ser Phe Ala Ala Val Ser Gly Leu Phe Ile Leu Pro Thr Tyr
 370 375 380
 Pro Thr Leu Val Ala Ala Val Gln Met Asp Asp Thr Gly Thr Thr Arg
 385 390 395 400
 Ile Gly Lys Phe Val Phe Asn His Pro Phe Phe Ile Pro Gly Thr Leu
 405 410 415
 Gly Val Ala Leu Ala Val Cys Phe Gly Phe Val Leu Gly Ser Phe Met
 420 425 430
 Leu

<210> 21
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 21
 atgttatTTta ctatccaact tatcataata ctgatatgtc tgTTTTatgg tgccagaaaag 60
 ggtggTatcg cgctgggTtt attaggcggt atcggTctgg tcattctggT cttcgtcttc 120
 caccttcagc caggtaaacc accagttgat gTcatgctgg ttatcattgc ggtggTggcg 180
 gcatcggcga ccttgcaagc ttcgggcggt cttgatgtca tgctgcaaat tgccgagaag 240
 ctgctgcgcc gcaaccgaa atatgtctca attgtcgcgc cgTTtTgtgac ctgtacactg 300
 accattcttt gcggtacggg tcatgtggTt tacaccattc tgccgatcat ctacgacgtc 360
 gccattaaga acaacatccg tccggaacgt ccgatggcgg caagttctat cggTgcacag 420
 atggggatta tcgccagTcc ggtgtcggTt gcggtcgtgt ctctggTtgc gatgctgggt 480
 aatgtcacct ttgatggTcg ccatcttgag ttcctcgatc tgctggcaat caccattcca 540
 tcgacgttaa tcggtatcct ggcgatcggt atcttcagct ggTtccgcgg taaagatctg 600
 gataaagacg aagagTtcca gaaattcatc tccgtaccgg aaaaccgtga gtatgtttac 660
 ggtgataccg cgacgtgct ggataaaaaa ctgccgaaaa gcaactggct ggcaatgtgg 720
 attttcctcg gggcaatcgc tGtagtcgcc cttcttggtg ctgattcgga cctgcgtcca 780
 tccttcggcg gcaaaccgct gTcgatggta ctggTtattc agatgtttat gctgctgacc 840
 ggggcgctga ttattatcct gaccaaacc aatcccgcgt ctatctcaaa aaacgaagtc 900
 ttccgttccg gtatgatcgc catcgTggcg gtgtacggta tcgcatggat ggcagaaacc 960
 atgttcggTg cgcatatgtc tgaaattcag ggcgtactgg gtgaaatggT gaaagagtat 1020
 ccgtgggcct atgccattgt tctgctgctg gTttccaagt ttgtaaactc tcaggctgcg 1080
 gcgctggcgg cgattgttcc ggtcgcgctg gcgatcggcg ttgatccggc atacatcgtg 1140
 gcttcagcac cggttgcta cggttattac atcctgccga cttatccgag cgatctggca 1200
 gcgattcagt ttgaccgttc cggcaccacc cacatcggtc gcttcgtcat caaccacagc 1260
 tttattctgc cggggttgat tggTgtgagc gtatcgTgcg tcttcggctg gatcttcgcc 1320
 gcgatgtacg ggttcttata a 1341

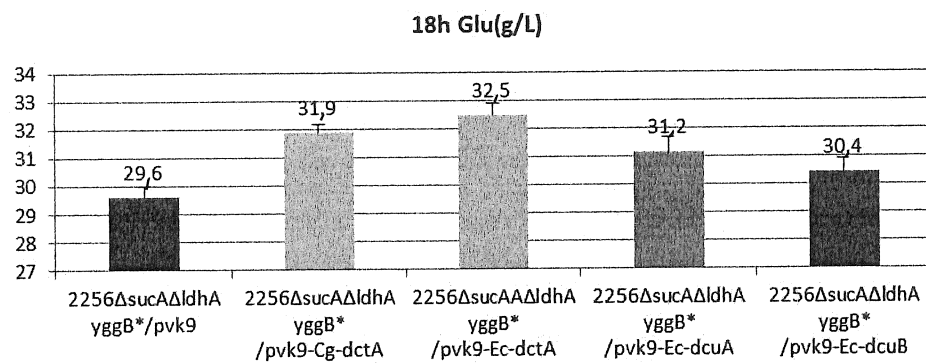
<210> 22
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 22
 Met Leu Phe Thr Ile Gln Leu Ile Ile Ile Leu Ile Cys Leu Phe Tyr
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Lys Gly Gly Ile Ala Leu Gly Leu Leu Gly Gly Ile Gly
 20 25 30
 Leu Val Ile Leu Val Phe Val Phe His Leu Gln Pro Gly Lys Pro Pro
 35 40 45
 Val Asp Val Met Leu Val Ile Ile Ala Val Val Ala Ala Ser Ala Thr
 50 55 60
 Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Asp Val Met Leu Gln Ile Ala Glu Lys
 65 70 75 80
 Leu Leu Arg Arg Asn Pro Lys Tyr Val Ser Ile Val Ala Pro Phe Val
 85 90 95
 Thr Cys Thr Leu Thr Ile Leu Cys Gly Thr Gly His Val Val Tyr Thr
 100 105 110
 Ile Leu Pro Ile Ile Tyr Asp Val Ala Ile Lys Asn Asn Ile Arg Pro
 115 120 125
 Glu Arg Pro Met Ala Ala Ser Ser Ile Gly Ala Gln Met Gly Ile Ile
 130 135 140
 Ala Ser Pro Val Ser Val Ala Val Val Ser Leu Val Ala Met Leu Gly
 145 150 155 160
 Asn Val Thr Phe Asp Gly Arg His Leu Glu Phe Leu Asp Leu Leu Ala
 165 170 175
 Ile Thr Ile Pro Ser Thr Leu Ile Gly Ile Leu Ala Ile Gly Ile Phe
 180 185 190
 Ser Trp Phe Arg Gly Lys Asp Leu Asp Lys Asp Glu Glu Phe Gln Lys
 195 200 205
 Phe Ile Ser Val Pro Glu Asn Arg Glu Tyr Val Tyr Gly Asp Thr Ala
 210 215 220
 Thr Leu Leu Asp Lys Lys Leu Pro Lys Ser Asn Trp Leu Ala Met Trp
 225 230 235 240
 Ile Phe Leu Gly Ala Ile Ala Val Val Ala Leu Leu Gly Ala Asp Ser
 245 250 255
 Asp Leu Arg Pro Ser Phe Gly Gly Lys Pro Leu Ser Met Val Leu Val
 260 265 270
 Ile Gln Met Phe Met Leu Leu Thr Gly Ala Leu Ile Ile Ile Leu Thr
 275 280 285
 Lys Thr Asn Pro Ala Ser Ile Ser Lys Asn Glu Val Phe Arg Ser Gly
 290 295 300
 Met Ile Ala Ile Val Ala Val Tyr Gly Ile Ala Trp Met Ala Glu Thr
 305 310 315 320
 Met Phe Gly Ala His Met Ser Glu Ile Gln Gly Val Leu Gly Glu Met
 325 330 335
 Val Lys Glu Tyr Pro Trp Ala Tyr Ala Ile Val Leu Leu Leu Val Ser
 340 345 350
 Lys Phe Val Asn Ser Gln Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ile Val Pro Val
 355 360 365
 Ala Leu Ala Ile Gly Val Asp Pro Ala Tyr Ile Val Ala Ser Ala Pro

370						375						380					
Ala	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Pro	Thr	Tyr	Pro	Ser	Asp	Leu	Ala		
385						390					395				400		
Ala	Ile	Gln	Phe	Asp	Arg	Ser	Gly	Thr	Thr	His	Ile	Gly	Arg	Phe	Val		
				405						410					415		
Ile	Asn	His	Ser	Phe	Ile	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Val	Ser	Val	Ser		
			420					425					430				
Cys	Val	Phe	Gly	Trp	Ile	Phe	Ala	Ala	Met	Tyr	Gly	Phe	Leu				
		435					440					445					

[Fig. 1]

(A)



(B)

